



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 168 342

A1

SYC

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 85810268.4

(51) Int. Cl.: C 12 N 15/00

(22) Anmeldetag: 10.06.85

C 12 P 19/34, C 12 P 21/02
C 07 K 7/10, C 12 N 9/99
C 12 N 1/20, A 61 K 37/02
A 61 K 39/00, C 12 N 5/00
G 01 N 33/53
//C12R1:19, C12R1:125,
C12R1:865

(30) Priorität: 14.06.84 CH 2882/84

(72) Erfinder: Liersch, Manfred, Dr.
Rütiring 26
CH-4125 Riehen(CH)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
15.01.86 Patentblatt 86/3

(72) Erfinder: Rink, Hans
Rebenstrasse 10
CH-4125 Riehen(CH)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(72) Erfinder: Märki, Walter, Dr.
Bremenstallstrasse 30
CH-4313 Möhlin(CH)

(71) Anmelder: CIBA-GEIGY AG
Klybeckstrasse 141
CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: Grütter, Markus Gerhard, Dr.
Nettenbergweg
CH-4146 Hochwald(CH)

(54) Verfahren zur Herstellung von Thrombin-Inhibitoren.

(72) Erfinder: Meyhack, Bernd, Dr.
Höhenweg 9
CH-4312 Magden(CH)

(57) Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, welche für die Aminosäuresequenz des Thrombin-Inhibitors Hirudin kodieren, solche DNA-Sequenzen enthaltende Hybridvektoren, mit solchen Hybridvektoren transformierte Wirtszellen, von solchen transformierten Wirtszellen produzierte neue Polypeptide mit Thrombin-Inhibitor-Aktivität, Verfahren zur Herstellung dieser DNA-Sequenzen, Hybridvektoren und transformierten Wirtszellen und Verfahren zur Herstellung dieser Thrombin-Inhibitoren mit Hilfe der transformierten Wirtszellen. Die erfindungsgemäß herstellbaren Hirudin-Verbindungen weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf.

EP 0 168 342 A1

4-14916/4Verfahren zur Herstellung von Thrombin-Inhibitoren

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, welche für die Aminosäuresequenz des Thrombin-Inhibitors Hirudin kodieren, solche DNA-Sequenzen enthaltende Hybridvektoren, mit solchen Hybridvektoren transformierte Wirtszellen, von solchen transformierten Wirtszellen produzierte neue Polypeptide mit Thrombin-Inhibitor-Aktivität, Verfahren zur Herstellung dieser DNA-Sequenzen, Hybridvektoren und transformierten Wirtszellen und Verfahren zur Herstellung dieser Thrombin-Inhibitoren mit Hilfe der transformierten Wirtszellen.

Im Plasma des gesunden Säugetierorganismus besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem fibrinolytischen System und dem Koagulationssystem, wodurch ein funktionstüchtiges Gefäßnetz aufrechterhalten wird. Bei Gefäßverletzungen lagert das Koagulationssystem eine Fibrin-Matrix ab, welche nach Erreichung des hämostatischen Zustands durch das fibrinolytische System wieder abgebaut wird. In Fällen, in denen das fibrinolytische Potential des Organismus nicht ausreicht, um gebildete intravaskuläre Thrombi abzubauen, z.B. bei Patienten, die unter Thromboembolien oder postoperativen Komplikationen leiden, erweist es sich als unerlässlich, den Organismus durch Verabreichung von thrombolytischen Mitteln oder Antikoagulantien zu unterstützen.

In der herkömmlichen Antikoagulationstherapie wurden bisher vor allem Heparin, ferner auch 4-Hydroxycumarin- und 1,3-Indandion-Derivate eingesetzt. Obwohl mit diesen Mitteln bemerkenswerte Erfolge erzielt worden sind, weisen sie doch einige Nachteile auf. So wirkt Heparin nicht direkt auf den Blutgerinnungsvorgang ein, sondern entfaltet seine koagulationshemmende Wirkung indirekt durch

Beschleunigung der Hemmung von Thrombin und des Faktors X durch Antithrombin III. Heparin geht im Organismus weiterhin zahlreiche unspezifische Reaktionen ein und wird vom Platelet-Faktor 4 neutralisiert, was insbesondere seine Anwendbarkeit bei der Verbrauchs-Koagulopathie bzw. disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) beeinträchtigt. Es besteht daher ein Bedarf nach alternativen und spezifischeren Mitteln zur Antikoagulationstherapie.

Seit langem ist ein natürliches im Blutegel (*Hirudo medicinalis*) vorkommendes Antikoagulans, Hirudin, bekannt. Hirudin ist ein aus 65 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit vollständig aufgeklärter Primärstruktur (1) und weist als strukturelle Charakteristika eine Anhäufung hydrophober Aminosäuren am N-Terminus und polarer Aminosäuren am C-Terminus, einen als Sulfatmonoester vorliegenden Tyrosin-Rest (Tyr^{63}) und drei Disulfidbrücken, deren exakte Anordnung allerdings noch nicht bekannt ist, auf.

Hirudin ist mit einem K_i -Wert (Komplex-Disssoziationskonstante) von $6 \cdot 10^{-11} M$ der stärkste bekannte Thrombin-Inhibitor und durch eine spezifische Affinität zu Thrombin charakterisiert; andere Enzyme der Blutgerinnungskaskade werden nicht inhibiert. Im Gegensatz zu Heparin übt Hirudin seinen inhibierenden Einfluss auf Thrombin direkt aus und wirkt nicht, wie jenes, über Antithrombin III. Der einzige pharmakologisch fassbare Effekt von gereinigtem Hirudin ist die Hemmung der Blutkoagulation bzw. die Prophylaxe von Thrombose. Bei intravenöser Verabreichung an Hunden war selbst bei hohen Dosen kein Einfluss auf Herzschlagfrequenz, Atmung, Blutdruck, Thrombozytenzahl, Fibrinogen und Hämoglobin zu beobachten. Bei Versuchen an der Ratte, am Schwein und am Hund erwies sich Hirudin als wirksam bei experimenteller Thrombose (hervorgerufen entweder durch Stasis oder durch Injektion von Thrombin), beim Endotoxin-Schock sowie bei DIC (disseminierter intravasaler Gerinnung). Bei direkten Vergleichsversuchen mit Heparin, wo immer sie durchgeführt wurden, zeigte sich Hirudin diesem überlegen.

Obwohl seit langem bekannt, erlangte Hirudin bis heute nicht die breite therapeutische Anwendung, die man aufgrund seiner ausgezeichneten biologischen Eigenschaften erwarten durfte. Seiner allgemeinen Anwendung in der Medizin steht nämlich als ein schwerwiegender Nachteil seine äusserst beschränkte Zugänglichkeit im Wege. Bis jetzt waren Hirudin-Präparate ausschliesslich aus teurem und schwer zugänglichem Naturmaterial, ausgehend von Blutegel-Extrakten durch zeit- und kostenaufwendige Isolier- und Reinigungsverfahren, erhältlich (vgl. Ref. 2). Die relativ lange Sequenz von 65 Aminosäuren liess auch die klassische Peptid-Synthese aus ökonomischen Gesichtspunkten wenig erfolgsversprechend erscheinen. Zur Herstellung ausreichender Mengen an Hirudin, welche detaillierte klinische Untersuchungen über dessen therapeutisches Potential und seine breite therapeutische Anwendung in der Antikoagulations-Therapie erst ermöglichen, müssen daher neue Wege beschritten werden.

Hierzu bietet sich insbesondere die rekombinierte DNA-Technologie an. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, die unterschiedlichsten physiologisch aktiven Polypeptide durch Kultivierung entsprechend genetisch modifizierter Mikroorganismen oder Säugetierzellkulturen herzustellen.

Der vorliegenden Erfindung liegt demgemäß die Aufgabe zugrunde, mit Hilfe von gentechnologischen Mitteln ein Expressionssystem zur Verfügung zu stellen, welches die mikrobiologische Herstellung von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität im industriellen Massstab erlaubt. Diese Aufgabe wird in der vorliegenden Erfindung gelöst durch die Bereitstellung von Hybridplasmiden, welche eine für die Aminosäuresequenz des Hirudins kodierende DNA-Sequenz enthalten, die von einer Expressionskontrollsequenz derart kontrolliert wird, dass in einer mit diesen Hybridvektoren transformierten Wirtszelle Polypeptide mit Hirudin-Aktivität exprimiert werden.

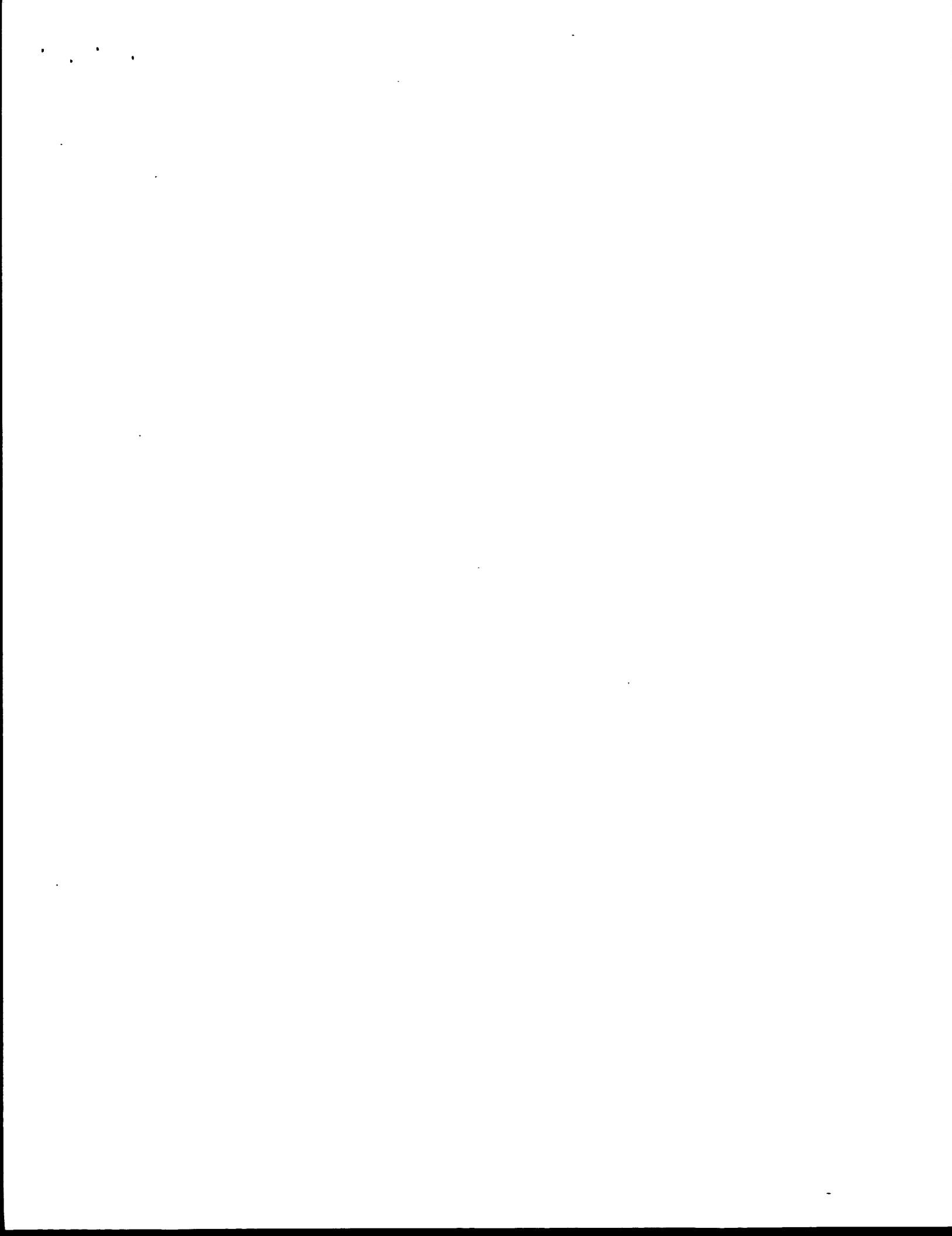
Es war zu erwarten, dass die Expression derartiger DNA-Sequenzen in transformierten Wirtszellen (mit Ausnahme von transformierten Egelzellen) in Abwesenheit eines zusätzlich eingebauten Sulfat-

übertragenden Enzym-Systems zu einem Produkt führen würde, dass sich von natürlichem Hirudin im wesentlichen durch das Fehlen des Sulfatrestes am Tyrosin-63 unterscheidet. Die biologische Funktion des Sulfatrestes in Proteinen im allgemeinen und im Hirudin im besonderen ist im einzelnen nicht definitiv geklärt; jedoch soll der Sulfat-Rest nach dem jetzigen Kenntnisstand die physiologischen Eigenschaften des Proteins nicht unwesentlich beeinflussen. So soll der Sulfat-Rest folgende Funktionen ausüben:

- (1) Positive Beeinflussung der biologischen Aktivität des Proteins;
- (2) Beteiligung an regulatorischen Zellprozessen (wie es bei der reversiblen Phosphorylierung bekannt ist);
- (3) Stimulierung der Sekretion, d.h. die Sulfatierung dient als Markierung für die Erkennung als sekretorisches Protein: Alle bekannten sulfatierten Proteine sind sekretorische oder transmembranale Proteine.

Ueberraschenderweise wurde jetzt gefunden, dass entgegen den theoretischen Vorstellungen die wertvollen biologischen Eigenschaften des Hirudins auch dann erhalten bleiben, wenn die charakteristische Sulfatmonoester-Gruppe vom phenolischen Hydroxyl des Tyr⁶³-Restes entfernt wird. Die mit Hilfe der erfindungsgemässen transformierten Mikroorganismen hergestellten Hirudin-Verbindungen ohne Sulfatrest ("Desulfatohirudine") erweisen sich nämlich gegenüber dem natürlichen Hirudin in ihren biologischen Eigenschaften, insbesondere in ihrer antikoagulativen Wirkung, qualitativ und quantitativ als zumindest ebenbürtig.

Im folgenden sind unter DNA-Sequenzen oder Genen, die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren, solche DNA-Sequenzen oder Gene zu verstehen, welche bei der Expression Hirudin-ähnliche Polypeptide ergeben, die sich von natürlichem Hirudin insbesondere durch das Fehlen der Sulfatester-Gruppe am Tyrosin-63 unterscheiden ("Desulfatohirudine").



Herstellung von DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, welche für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren, und Fragmente davon.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren, und von Fragmenten davon, gekennzeichnet dadurch, dass man aus genomischer Egel-DNA das Hirudin-Strukturen isoliert, oder aus Hirudin-mRNA eine komplementäre doppelsträngige Hirudin-DNA (Hirudin-ds cDNA) herstellt, oder dass man ein für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierendes Gen oder Fragmente davon mittels chemischer und enzymatischer Verfahren herstellt.

Die Gewinnung von genomischer Hirudin-DNA und von Hirudin-ds cDNA erfolgt beispielsweise nach an sich bekannten Methoden. So gewinnt man genomische Hirudin-DNA beispielsweise aus einer Egel-Genbank, welche das Hirudin-Gen enthält, indem man die Egel-DNA-Fragmente in einem Mikroorganismus kloniert und Klone, die Hirudin-DNA enthalten, identifiziert, beispielsweise durch Kolonie-Hybridisierung unter Verwendung eines radioaktiv markierten, Hirudin-DNA spezifischen Oligodesoxynucleotids, welches mindestens 15, vorzugsweise 15 bis 30, Desoxynucleotide enthält. Die so erhaltenen DNA-Fragmente enthalten neben dem Hirudin-Gen in der Regel weitere unerwünschte DNA-Bestandteile, welche durch Behandlung mit geeigneten Exo- oder Endonucleasen abgespalten werden können.

Doppelsträngige Hirudin-cDNA kann beispielsweise hergestellt werden, indem man aus geeigneten, vorzugsweise zur Hirudin-Bildung induzierten Egelzellen mRNA gewinnt, das so erhaltene mRNA-Gemisch in an sich bekannter Weise an Hirudin-mRNA anreichert, diese mRNA als Templat für die Herstellung von einsträngiger cDNA verwendet, daraus mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die ds cDNA synthetisiert und diese in einen geeigneten Vektor kloniert. Klone, die Hirudin-cDNA enthalten, werden beispielsweise, wie oben beschrieben,

durch Koloniehybridisierung unter Verwendung eines radioaktiv markierten, Hirudin-DNA spezifischen Oligodesoxynucleotids identifiziert.

Die auf diese Weise gewonnene genomische Hirudin-DNA oder die Hirudin-cDNA werden vorzugsweise am 5'- und am 3'-Ende mit chemisch synthetisierten Adapter-Oligodesoxynucleotiden verknüpft, welche die Erkennungssequenz für eine oder verschiedene Restriktionsendonuclease(n) enthalten und damit den Einbau in geeignete Vektoren erleichtern. Zusätzlich muss das Adaptermolekül für das 5'-Ende der Hirudin-DNA bzw. -cDNA noch das Translationsstartsignal (ATG) enthalten. Das Translationsstartsignal muss derart angeordnet sein, dass ihm das Codon für die erste Aminosäure des Hirudins direkt folgt.

Da die Struktur des natürlichen Hirudin-Gens nicht bekannt ist und die chemische Synthese eines für die Aminosäuresequenz des Hirudins kodierenden Gens ("Desulfatohirudin-Gen") auf Grund der modernen Synthesemöglichkeiten Vorteile, insbesondere in zeitlicher Hinsicht, bietet, stellt letztere eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

Chemische Synthese eines Desulfatohirudin-Gens

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung eines Strukturgens für Desulfatohirudin oder von Fragmenten davon, dadurch gekennzeichnet, dass man Segmente des kodierenden und des komplementären Stranges des Desulfatohirudin-Gens chemisch synthetisiert und erhältliche Segmente enzymatisch in ein Strukturgen des Desulfatohirudins oder in Fragmente davon überführt.

Die Erfindung betrifft ferner doppelsträngige DNAs, die für Desulfatohirudin kodieren.

Die erfundungsgemäßen DNAs enthalten zusätzlich zu den Codons für Desulfatohirudin Translations-Start- und Stoppsignale, die eine Expression in geeigneten Wirtszellen, beispielsweise E. coli, ermöglichen, ferner Nukleotidsequenzen an den Enden, die für einen Einbau in einen Vektor geeignet sind.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung umfasst die DNA am 5'-Ende eine durch ein Restriktionsenzym schneidbare Nukleotidsequenz gefolgt vom Translations-Startsignal, Codons für die Aminosäuren von Hirudin, die gegebenenfalls an einer oder mehreren Stellen das Schneiden durch ein Restriktionsenzym ermöglichen, ein Translations-Stopsignal und am 3'-Ende eine durch ein Restriktionsenzym schneidbare Nukleotidsequenz. Erfundungsgemäß anwendbare Restriktionsenzyme sind beispielsweise EcoRI, EcoRII, BamHI, HpaII, PstI, HinfI oder HindIII.

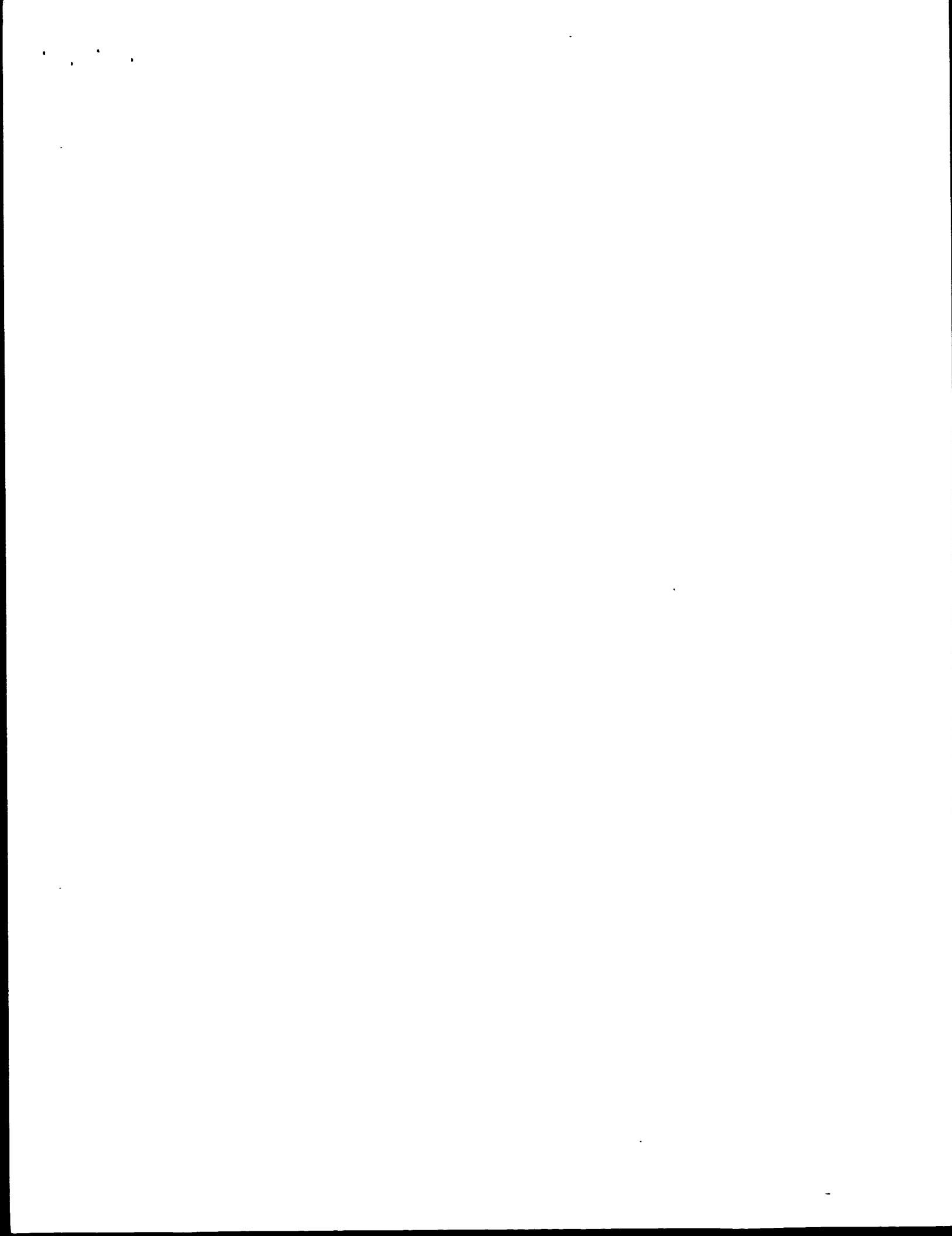
Insbesondere umfasst die Erfindung eine doppelsträngige DNA bestehend aus einer Nukleotidsequenz der Formel I und der komplementären Nukleotidsequenz

5' (X') _n		Met								
		ATG	Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu
			GTX	GTX	TAY	ACX	GAY	TGY	ACX	GAM
Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys	Gly	Cys	
QRS	GGX	CAM	AAV	YTZ	TGY	YTZ	TGY	GGX	TGY	
Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln			
GAM	GGX	QRS	AAV	GTX	TGY	GGX	CAM			
Gly	Asn	Lys	Cys	Ile	Leu	Gly	Ser			
GGX	AAV	AAM	TGY	ATN	YTZ	GGX	QRS			
Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val			
GAY	GGX	GAM	AAM	AAV	CAM	TGY	GTX			
Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro			
ACX	GGX	GAM	GGX	ACX	CCX	AAM	CCX			
Gln	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe			
CAM	QRS	CAY	AAV	GAY	GGX	GAY	TTY			
Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu			
GAM	GAM	ATN	CCX	GAM	GAM	TAY	YTZ			
Gln	NON	(X') _m	3'							
CAM	TMK									

(I)

worin die Nukleotidsequenz beginnend mit dem 5'-Ende dargestellt ist und zum besseren Verständnis die Aminosäuren, für die jedes Triplet codiert, angegeben sind, und worin bedeuten

- A Desoxyadenosyl,
- T Thymidyl,
- G Desoxyguanosyl,
- C Desoxycytidyl,
- X A, T, C oder G,
- Y T oder C,
- Z A, T, C oder G, wenn Y = C,
- oder Z = A oder G, wenn Y = T,
- Q T oder A,
- R C und S = A, T, C oder G, wenn Q = T,
- oder R = G und S = T oder C, wenn Q = A,



M A oder G,
L A oder C,
N T, C oder A
R A oder G, wenn M = A,
oder K = A, wenn M = G,

und (X') _n und (X') _m Nukleotidsequenzen mit n und m grösser als 3 und kleiner als 100, insbesondere grösser als 5 und kleiner als 15, bedeuten, welche durch ein Restriktionsenzym erkannt und geschnitten werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die DNA-Sequenz am 5'-Ende eine durch EcoRI spaltbare, in der Mitte eine durch EcoRII spaltbare und am 3'-Ende eine durch BamHI spaltbare Nukleotidsequenz.

In erster Linie umfasst die Erfindung eine doppelsträngige DNA, welche von E. coli bevorzugte und für die Aminosäuren von Hirudin kodierende Triplets enthält. Solche Triplets sind insbesondere

für Glycin (Gly)	GGT
Cystein (Cys)	TGC
Valin (Val)	GTT
Leucin (Leu)	CTG
Serin (Ser)	ICT
Threonin (Thr)	ACC
Phenylalanin (Phe)	TTC
Tyrosin (Tyr)	TAC
Methionin (Met)	ATG
Asparaginsäure (Asp)	GAC
Glutaminsäure (Glu)	GAA
Lysin (Lys)	AAA

Isoleucin (Ile)	ATC
Histidin (His)	CAC
Prolin (Pro)	CCG
Glutamin (Gln)	CAG
Asparagin (Asn)	AAC

Bevorzugtes Stoppsignal (NON) ist der Codon TAG.

Eine bevorzugte Ausführungsform eines für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierenden Gens in der oben dargestellten Weise ist die DNA der Formel II.

MetValValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly
 CTGGAATTCATGGTTGTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCCTGTGCGAAGGT
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTGGACACGGACACGCTTCCA
 (EcoRI)

SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysVal
 TCTAACCTTGCAGGTCACGGTAACAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTAAAAAAAACCAGTGCCTT
AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTGGTCACGCAA
 (EcoRII)

ThrGlyGluGlyThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGlu
 ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCGGAAGAA
 TGGCCACTCCATGGGCTTGGCGTCAGAGTGTGCTGCCACTGAACCTCTTGGCCTTCTT

TyrLeuGlnNON
 TACCTGCAGTAGGATCCTG
 ATGGACGTCATCCTAGGAC
 (BamHI) (II).

worin A, T, G, C die unter Formel I angegebenen Bedeutungen haben und zum besseren Verständnis die Aminosäuren, für die jedes Triplet kodiert, und die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angegeben sind.

Die Erfindung umfasst auch Fragmente einer DNA, die für Desulfato-hirudin, kodiert.

Insbesondere umfasst die Erfindung doppelsträngige DNA-Fragmente des Desulfatohirudin-Gens, besonders solche, deren Enden durch Restriktionsenzyme geschnitten werden können. Solche doppelsträngigen DNA-Fragmente des Hirudin-Gens haben insbesondere 30 bis 70 Basenpaare.

Beispielsweise umfasst die Erfindung die DNA-Fragmente der Formel III (F_1) und der Formel IV (F_2):

MetValValTyrThrAspCysIhrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGly
 CTGGAATTCTATGGTTGTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGCT
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCA
 (EcoRI)

SerAsnValCysGlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySer
 TCTAACGTTTGCGGTCAAGGTAACAAATGCATCTGGGTTCTG
 AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTACGTAGGACCCAAAGAC
 (EcoRII)

F_1 (III)

IleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGlyThrProLysPro
 CATCCTGGTTCTGACGGTGAAAAAAACAGTGCCTAACGGTGAAAGGTACCCCCGAAACCG
GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTGGTCACGCAATGCCACTTCCATGGGGCTTGGC
 (EcoRII)

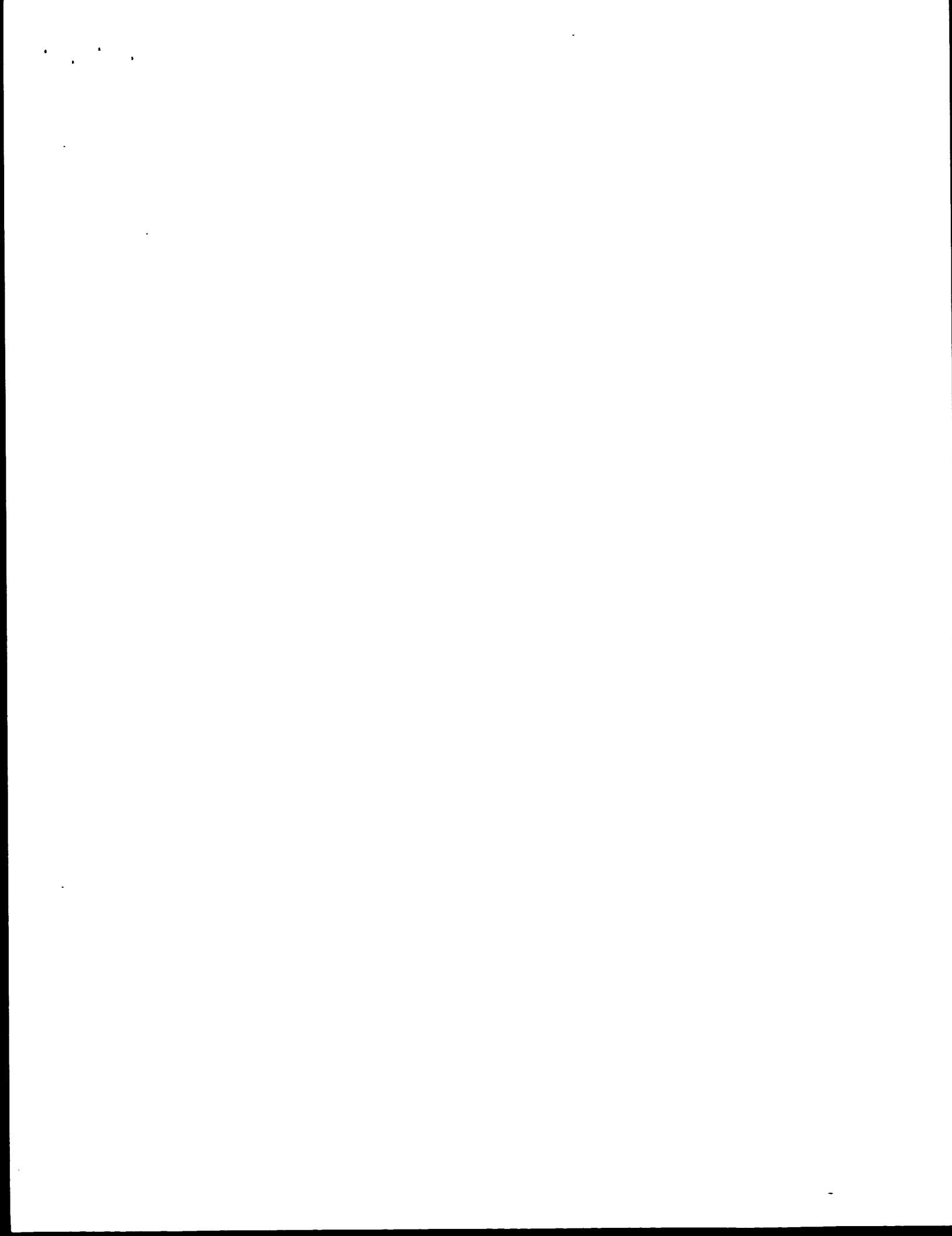
GlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluTyrLeuGlnNON
 CAGTCTCACAAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCGGAAAGAATACTGCAGTAGGATCCTG
GTCAGAGTGTGCTGCCACTGAAGCTTCTTAGGGCCTCTTATGGACGTCATCCTAGGAC
 (BamHI)

F_2 (IV)

Die Erfindung umfasst auch einsträngige DNA-Fragmente des Desulfatohirudin-Gens, insbesondere solche, die sich durch chemische und/oder enzymatische Methoden zum Desulfatohirudin-Gen zusammenfügen lassen. In erster Linie betrifft die Erfindung einsträngige DNA-Fragmente mit mehr als zwanzig Nukleotiden, insbesondere mit 20 bis 70 Nukleotiden.

Vorzugsweise betrifft die Erfindung die in den Beispielen beschriebenen einsträngigen und doppelsträngigen DNA-Fragmente.

Methoden der Synthese von DNA sind von S.A. Narang (3) zusammenfassend dargestellt worden. Die bekannten Synthesetechniken erlauben die Herstellung von Polynukleotiden mit einer Länge von gegen 20 Basen in guter Ausbeute, hoher Reinheit und in verhältnismässig kurzer Zeit. Geeignet geschützte Nukleotide werden durch die Phosphodiestermethode (4), die noch effizientere Phosphotriester-methode (5) oder Phosphit-Triestermethode (6) miteinander verknüpft. Eine Vereinfachung der Synthese der Oligo- und Polynukleotide wird mit der Festphasen-Methode ermöglicht, bei der die Nukleotidketten an ein geeignetes Polymer gebunden sind. Itakura et al. (7) verwenden bei der Festphasen-Synthese anstelle einzelner Nukleotide durch Phosphotriester-Methode geknüpfte Trinukleotide, die so in kurzer Zeit und guten Ausbeuten beispielsweise zu einem Polynukleotid mit 31 Basen kondensiert werden können. Die eigentliche doppelsträngige DNA kann aus chemisch hergestellten kurzen Segmenten enzymatisch aufgebaut werden. Khorana et al. (8) verwenden dazu überlappende Polynukleotid-Sequenzen aus beiden DNA-Strängen, die durch Basen-Paarung in richtiger Anordnung zusammengehalten und dann durch das Enzym DNA-Ligase chemisch verknüpft werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, je eine Polynukleotid-Sequenz aus den beiden DNA-Strängen mit einem kurzen überlappenden Segment in Gegenwart der vier benötigten Desoxynukleosid-Triphosphate mit einer DNA-Polymerase, z.B. DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der Polymerase I, T₄ DNA-Polymerase, oder mit AMV (avian myeloblastosis virus) reverse Transcriptase, zu inkubieren. Dabei werden durch Basenpaarung die beiden Polynukleotid-Sequenzen in der richtigen Anordnung zusammengehalten und durch das Enzym mit den benötigten Nukleotiden zu einer vollständigen doppelsträngigen DNA ergänzt (9). Itakura et al. (10) beschreiben, wie basierend auf diesem Prinzip in Gegenwart von DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aus 4 chemisch synthetisierten Fragmenten einer Länge von 39 bis 42 Basen ein 132 Basen-Paare langes Segment des humanen Leukozyten-Interferon α_2 -Gens aufgebaut werden kann, wobei 40 % Einsparung an chemischer Synthese gegenüber der oben beschriebenen Methode, bei der nur Ligase verwendet wird, erzielt werden.



Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von DNAs, welche ein Strukturgen des Desulfatohirudins enthalten und für eine Expression in Wirtszellen geeignet sind, und deren Enden einen Einbau in Vektoren ermöglichen, und von Fragmenten davon, dadurch gekennzeichnet, dass

- a) ein geeignet geschütztes Desoxynukleosid an einen festen Träger gebunden wird,
- b) geeignet geschützte Di-, Tri- oder Tetranukleotide nach der Phosphotriester- oder Phosphit-Methode hergestellt werden,
- c) ein an den Träger gebundenes Desoxynukleosid oder Oligodesoxy-nukleotid mit geeignet geschützten Mono- oder (gemäß b) hergestellten) Di-, Tri- oder Tetranukleotiden nach der Phosphotriester- oder der Phosphit-Methode verknüpft wird,
- d) nach c) erhältliche, an Träger gebundene Oligodesoxynukleotide mit einer Länge zwischen etwa 20 und etwa 70 Basen vom Träger abgespalten, gegebenenfalls gereinigt, von Schutzgruppen befreit und die freien 5'-terminalen Hydroxygruppen phosphoryliert werden,
- e1) 2 Oligodesoxynukleotide einer Länge von je etwa 20 bis etwa 70 Basen aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang mit mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15, überlappenden Basenpaaren anelliert und mit einer DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate zu doppelsträngigen DNA-Segmenten (Fragmenten des Desulfatohirudin-Gens) ergänzt werden,
und gegebenenfalls 2 doppelsträngige DNA-Segmente mit geeigneten gemäß d) phosphorylierten Enden mit einer Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen verknüpft werden,
oder 2 erhältliche doppelsträngige DNA-Segmente in geeignete Vektoren subkloniert, anschliessend gemäß d) phosphoryliert und mit einer Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen verknüpft werden, oder
- e2) alternativ je 2 Oligodesoxynukleotide aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang mit einer Länge von z.B. 20 bis 70 Basen und mit je mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15, über-

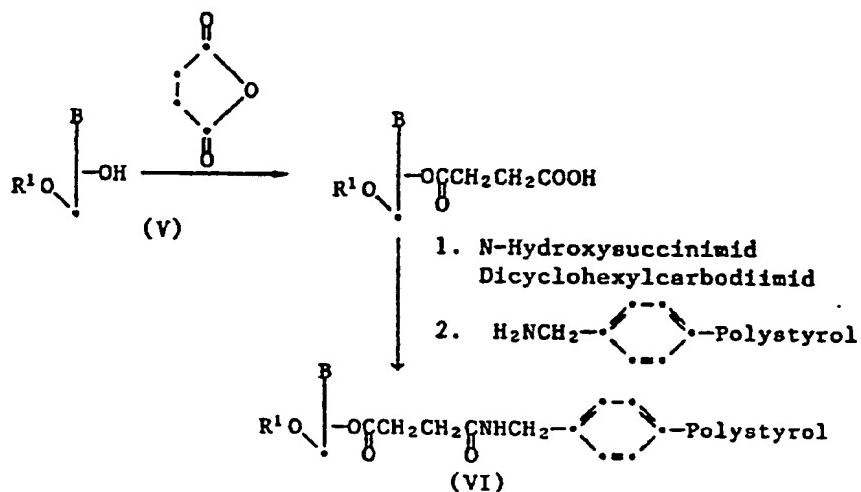
lappenden Basenpaaren anelliert, mit einer DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate aufgefüllt und mit Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen verknüpft werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist an sich bekannt, ermöglicht aber erst durch geeignete Kombination der Bedingungen und erfindungswesentliche Verbesserungen die Herstellung von für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierenden DNAs.

In Schritt a) können eine Vielzahl von festen Trägermaterialien, wie Polystyrol verschiedener Vernetzung und Quellfähigkeit, Polyacrylamide, Polyacrylamid-Copolymere, auf anorganisches Material wie Kieselguhr, Kieselgel oder Alox aufgezogene Polyamide oder funktionalisierte Silane, verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als feste Trägermaterialien quervernetzte Polystyrole eingesetzt, die über "Spacer", wie Alkylen-Gruppen mit 2 bis 12 C-Atomen unterbrochen von 1 bis 5 polaren zweiwertigen funktionellen Gruppen, wie Imino, Oxo, Thio, Oxycarbonyl oder Amidocarbonyl, auf an sich bekannte Weise mit der 5'-OH-Gruppe geeignet geschützter Desoxynukleoside verknüpft werden. Besonders bevorzugt ist die Reaktion von in 5'-Stellung und gegebenenfalls im Basenteil geschützten Nukleosiden der Formel V, worin R¹ eine durch Säure abspaltbare Schutzgruppe, wie eine Triaryl-methyenschutzgruppe, beispielsweise eine 4-Methoxytrityl- oder eine 4,4'-Dimethoxytritylgruppe, oder eine Triniederalkylsilylschutzgruppe, beispielsweise eine tert.-Butyldimethylsilylgruppe, und worin B eine gegebenenfalls geschützte Base ausgewählt aus Thymyl, Cytosyl, Adenyl oder Guanyl bedeutet, mit Bernsteinsäureanhydrid, gegebenenfalls in Gegenwart von Basen, wie Pyridin, Triäthylamin oder Dimethylaminopyridin, gefolgt von der Reaktion mit amino-methyliertem Polystyrol, das durch 0,5 bis 2 % Divinylbenzol quer-vernetzt ist, mit Hilfe von den Carbonsäure-Rest aktivierenden Reagentien, vorzugsweise N-Hydroxysuccinimid, oder p-Nitrophenol und wasserentziehenden Mitteln, wie Carbodiimiden, beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid (Schema 1).

Die Umsetzung erfolgt in einem inerten nicht-protischen Lösungsmittel, z.B. Pyridin, Tetrahydrofuran, Dioxan, Essigsäureäthylester, Chloroform, Methylenchlorid, Dimethylformamid oder Diäthylacetamid oder in Mischungen davon, bei Raumtemperatur oder leicht erhöhter oder erniedrigter Temperatur, z.B. in einem Temperaturbereich von ca. -10°C bis ca. 50°C , bevorzugt bei Raumtemperatur, die Umsetzung in Gegenwart des wasserentziehenden Mittels auch bei niedrigerer Temperatur, z.B. bei ca. 0°C .

Schema 1



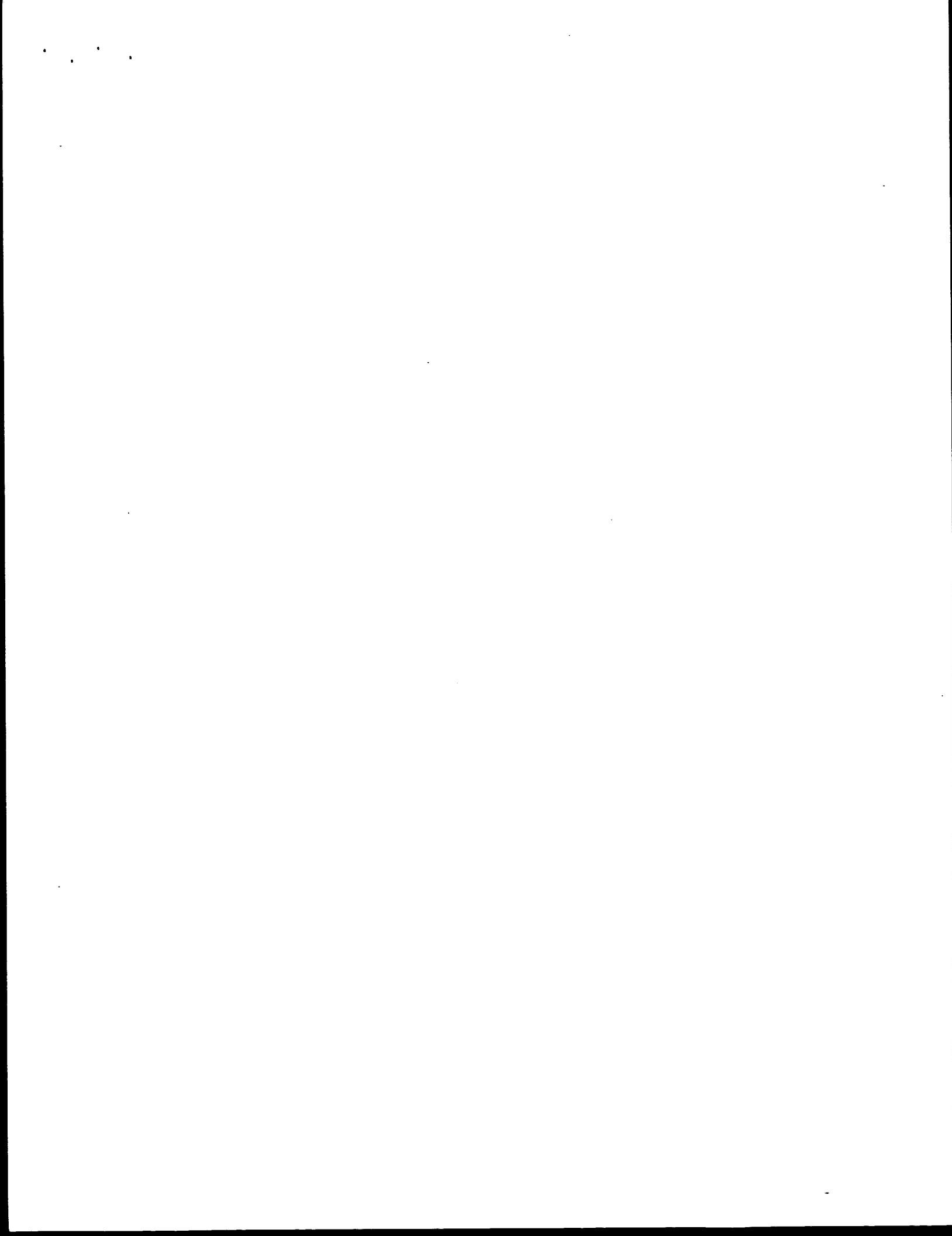
Bei der erfindungsgemässen Herstellung von Di-, Tri- oder Tetraknukleotiden gemäss Schritt b) (Schema 2) werden in 5'-Stellung und gegebenenfalls im Basenteil geschützte Nukleoside der Formel V, worin R¹ und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit aktivierten Phosphorestern der Formel VII, worin X¹ und X² unabhängig voneinander Hydroxy oder davon abgeleitete Salze, Halogen, Imidazolyl, 1,2,4-Triazol-1-yl, Tetrazolyl oder 1-Benztriazolyloxy und X² zusätzlich auch 2-Cyanoäthyloxy, 2-Trihalogenäthyloxy, 2-Arylsulfonyläthyloxy, 2-Niederalkylthioäthyloxy, 2-Arylthioäthyloxy oder 2-(4-Nitrophenyl)-äthyloxy und R² eine durch eine Base oder ein Nukleophil, wie Ammoniumhydroxid, Thiophenolat oder ein Aryaldoximat, abspaltbare Schutzgruppe, wie gegebenenfalls durch Halogen, Nitro und/oder Niederalkyl substituiertes Phenyl, Methyl

oder gegebenenfalls durch Nitro substituiertes Benzyl, oder eine durch Metallionen abspaltbare Schutzgruppe, wie 8-Chinolyl oder 5-Chloro-8-chinolyl, bedeutet, gegebenenfalls in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln oder in Gegenwart von Basen umgesetzt.

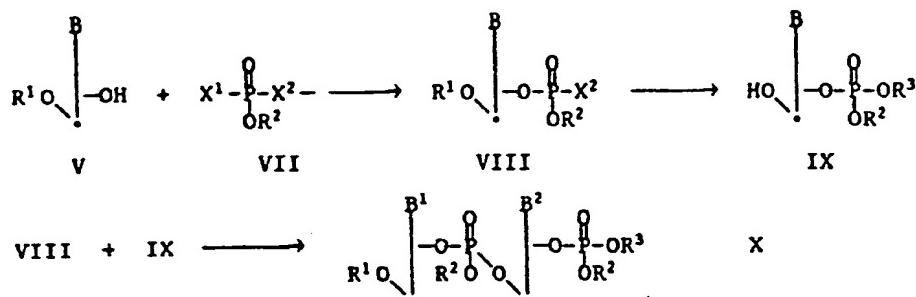
Anschliessend wird eine dermassen gebildete Verbindung der Formel VIII, worin R¹, X² und R² die oben angegebenen Bedeutungen haben, zuerst gegebenenfalls mit einem 2-substituierten Aethanol umgesetzt, das den Rest X² in eine Gruppe OR³ umwandelt, worin R³ Cyanoäthyl, 2-Trihalogenäthyl, 2-Arylsulfonyläthyl, 2-Niederalkylthioäthyl, 2-Arylthioäthyl oder 2-(4-Nitrophenyl)-äthyl bedeutet, und dann die Schutzgruppe R¹ abgespalten, und die dermassen hergestellte Verbindung der Formel IX mit einer andern Verbindung der Formel VIII, gegebenenfalls in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln oder in Gegenwart von Basen, zu einem Dinukleotid X umgesetzt (Schema 2). Gegebenenfalls wird eine Verbindung der Formel VIII durch Reaktion mit Basen und Wasser in eine andere Verbindung der Formel VIII, worin X² Hydroxy oder davon abgeleitete Salze bedeutet, umgewandelt.

Die Umsetzungen erfolgen in einem der oben genannten inerten Lösungsmittel bei Raumtemperatur oder leicht erhöhter oder erniedrigter Temperatur, z.B. bei Raumtemperatur.

Die Abspaltung der Schutzgruppe R¹ wird z.B. mit Hilfe von Säuren, wie Mineralsäuren, z.B. Salzsäure oder Schwefelsäure, Carbonsäure, z.B. Essigsäure, Trichloressigsäure oder Ameisensäure, Sulfonsäure, z.B. Methan- oder p-Toluolsulfonsäure, oder insbesondere Lewis-Säure, z.B. Zinkchlorid, Zinkbromid, Aluminiumchlorid, Dialkyl-aluminiumhalogenid, z.B. Dibutyl- oder Diäthylaluminiumchlorid, oder Bortrifluorid, bei 10°C bis 50°C, insbesondere bei Raumtemperatur, durchgeführt. Bei Verwendung eines Dialkylaluminiumhalogenids erfolgt die Abspaltung in einem lipophilen Lösungsmittel, insbesondere in Toluol, und bei Verwendung einer anderen der genannten Lewis-Säuren in einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus einem Halogenkohlenwasserstoff, z.B. Methylenchlorid, und einem Niederalkanol, z.B. Aethanol oder Isopropanol.

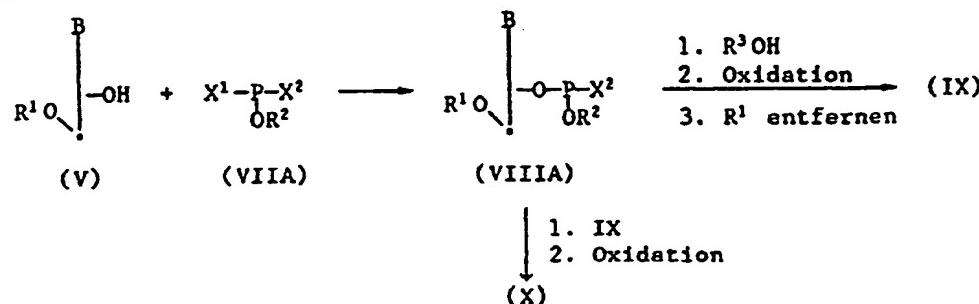


Schema 2



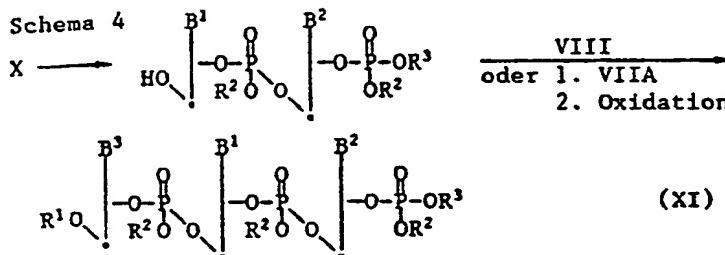
Die Herstellung von Dinukleotiden der Formel X umfasst auch die Reaktion von Nukleosiden der Formel V, worin R¹ und B die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit Phosphiten der Formel VIIA, worin X¹ Halogen, insbesondere Chlor, X² Halogen, insbesondere Chlor, oder Diniederalkylamino, insbesondere Dimethylamino oder Diisopropylamino, oder Morpholino, Piperidino oder Pyrrolidino, bedeuten und R² die für VII oben angegebene Bedeutung, insbesondere Methyl, hat, gegebenenfalls in Gegenwart einer geeigneten Base (Schema 3). Die erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen der Formel VIIIA werden einerseits mit einem 2-substituierten Aethanol umgesetzt, das den Rest X² in eine Gruppe OR³ umwandelt, worin R³ die oben angeführten Bedeutungen hat, dann mit einem Oxidationsmittel, beispielsweise Jod in Gegenwart einer Base, zum Phosphat oxidiert und die Schutzgruppe R¹ abgespalten, wobei eine Verbindung der Formel IX entsteht, andererseits mit einer Verbindung der Formel IX umgesetzt, dann mit einem Oxidationsmittel, beispielsweise Jod in Gegenwart einer Base, zu einer Verbindung der Formel X oxidiert.

Schema 3



Zur erfindungsgemäßen Herstellung von Trinukleotiden wird in Dinukleotiden der Formel X, worin R^1 , R^2 und R^3 die oben angegebenen Bedeutungen haben und worin B^1 und B^2 unabhängig voneinander Thymyl, Cytosyl, Adenyl oder Guanyl bedeuten, die Schutzgruppe R^1 abgespalten und die erhaltene Verbindung mit einer Verbindung der Formel VIII, gegebenenfalls in Gegenwart von wasserentziehenden Mitteln oder in Gegenwart von Basen, oder mit einer Verbindung der Formel VIIIA und nachfolgender Oxidation umgesetzt, wobei eine Verbindung der Formel XI entsteht (Schema 4). Die Abspaltung der Schutzgruppe R^1 und die Kondensation zu den Trinukleotiden der Formel XI erfolgt in gleicher Weise, wie bei der Herstellung der Dinukleotide der Formel X beschrieben.

Schema 4



Zur erfindungsgemäßen Herstellung von Tetranukleotiden werden Trinukleotide der Formel XI so zur Reaktion gebracht, wie oben für Dinukleotide der Formel X beschrieben.

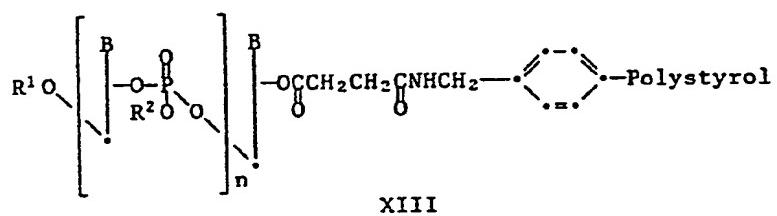
In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird als Schutzgruppe R¹ die 4-Methoxytritylgruppe, als Schutzgruppe R² eine durch Chlor substituierte Phenylgruppe, insbesondere 2-Chlorphenyl, und als Schutzgruppe R³ die 2-Cyanoäthylgruppe verwendet. Bevorzugter Rest X¹ und X² in der Verbindung der Formel VII ist der 1-Benztriazolyl-oxy-Rest.

Trinukleotide der Formel XI werden vorzugsweise hergestellt, indem in Dinukleotiden der Formel X die Schutzgruppe R¹ abgespalten und die erhaltene Verbindung mit Verbindungen der Formel VIII, worin X² Hydroxyl oder davon abgeleitete Salze bedeutet, in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels umgesetzt wird (Schema 4). Erfindungsgemäße wasserentziehende Mittel sind beispielsweise 2,4,6-Tri-methyl- oder Triisopropylbenzolsulfonyl-chlorid, -imidazol, -tetrazol oder -1,2,4-triazol, gegebenenfalls substituiert durch Nitro. Bevorzugtes wasserentziehendes Mittel ist 1-(2,4,6-Trimethylbenzolsulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (XII).

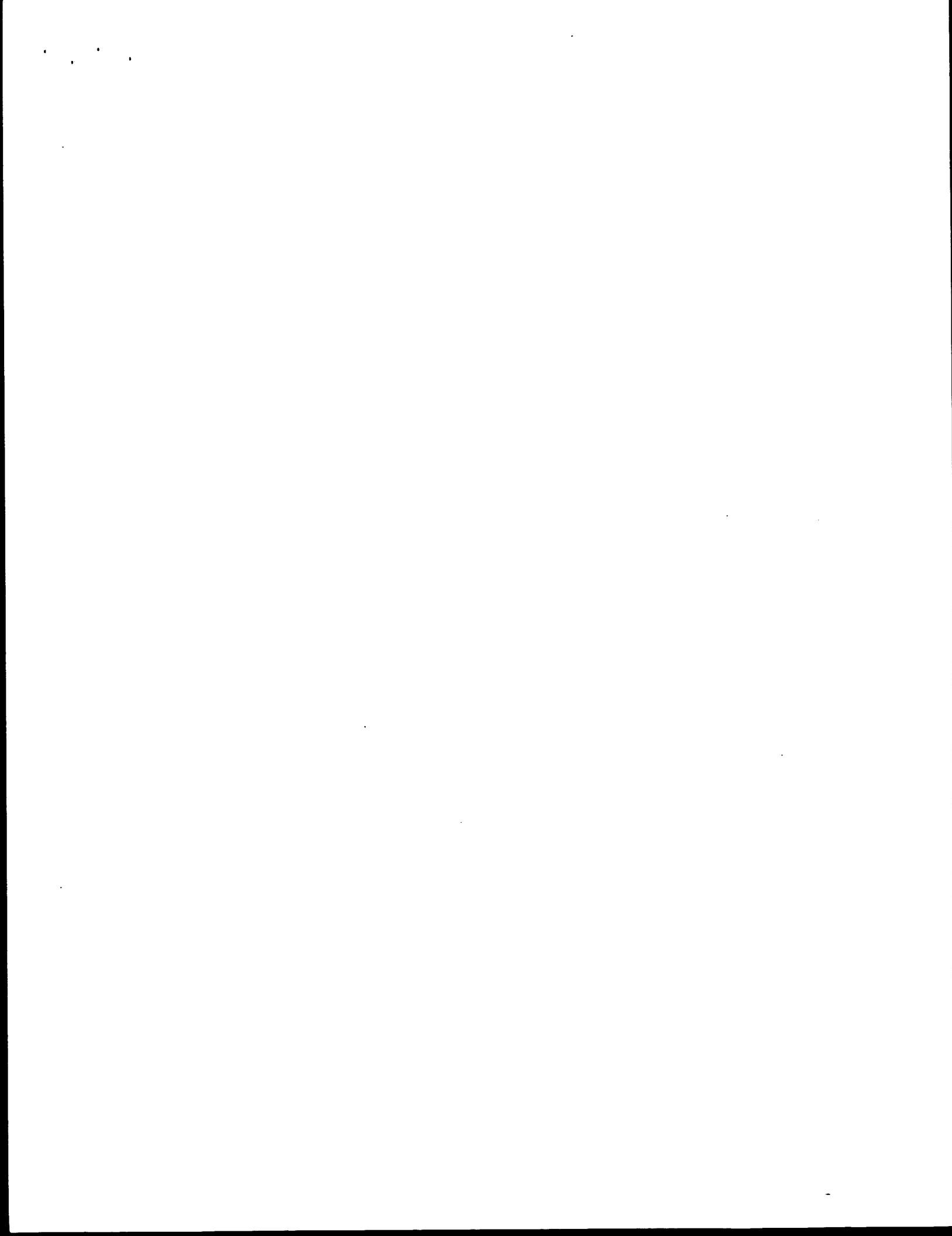
Vorzugsweise werden Nukleoside eingesetzt, deren freie Aminogruppe im Basenteil geschützt ist. Bevorzugte Schutzgruppen sind Benzoyl für Adenin, Benzoyl oder 4-Methoxybenzoyl für Cytosin, Isobutyryl oder Diphenylacetyl für Guanin. Thymin wird vorzugsweise ohne Schutzgruppe eingesetzt.

Bei der erfindungsgemäßen Herstellung von Oligonukleotiden gemäß Schritt c) wird eine an sich bekannte Apparatur mit halbautomatischem oder vollautomatischem, mikroprozessorgesteuertem Zuführungssystem für Lösungsmittel und Reagentien verwendet. In einer gemäß Schritt a) hergestellten Verbindung der Formel VI wird die Schutzgruppe R¹, wie oben beschrieben, abgespalten und anschliessend entweder mit einer Verbindung der Formel VIII, oder mit einer Verbindung der Formel VIIIA, oder mit einer Verbindung der Formel X oder XI, in der vorgängig die Schutzgruppe R³ mit Basen abgespalten worden ist (eine Gruppe 2-Cyanoäthyl beispielsweise mit einem Triniederalkylamin, z.B. Triäthylamin, in einem der oben genannten inerten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische bei 10°C bis 40°C,

insbesondere bei Raumtemperatur), gegebenenfalls in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels oder in Gegenwart einer Base umgesetzt. Die Erfindung umfasst auch Reaktionen, bei denen anstelle eines Dinukleotids der Formel X oder eines Trinukleotids der Formel XI ein gemäss Schritt b) hergestelltes Tetranukleotid eingesetzt wird. Wird ein Phosphit der Formel VIIIA verwendet, so wird anschliessend mit einem Oxidationsmittel, beispielsweise Jod in Gegenwart einer Base, nachbehandelt. Die dermassen hergestellte Verbindung der Formel XIII, worin R¹, R² und B die oben angegebenen Bedeutungen haben und n eine ganze Zahl von 1 bis 4 ist, wird so oft den für die Verbindung der Formel VI beschriebenen Reaktionsschritten (Abspaltung von R¹, Reaktion mit VIII, VIIIA, X, XI oder dem entsprechenden Tetranukleotid, gegebenenfalls mit oxidativer Nachbehandlung) unterworfen, bis eine Verbindung der Formel XIII entsteht, in der n eine beliebige ganze Zahl zwischen etwa 19 und etwa 69 ist.



In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Schutzgruppe R¹ 4-Methoxytrityl verwendet und die Abspaltung mit Zinkbromid in Gegenwart einer CH- oder NH-aciden Verbindung, insbesondere 1,2,4-Triazol oder Tetrazol, durchgeführt. Die Verwendung von z.B. 1,2,4-Triazol bei der Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe ist neu und führt überraschenderweise dazu, dass die Abspaltung schnell, mit hohen Ausbeuten und ohne Nebenreaktionen abläuft. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Zinkbromid und 1,2,4-Triazol in einem molaren Verhältnis zwischen 20:1 und 100:1 in einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus einem sprotischen Lösungsmittel und einem Alkohol, beispielsweise Methylenchlorid und 2-Propanol.



In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird eine Verbindung der Formel VI oder der Formel XIII, in der die Schutzgruppe R¹ abgespalten worden ist, mit einem Trinukleotid der Formel XI, in dem die Schutzgruppe R³ abgespalten worden ist, umgesetzt in Gegenwart eines wasserentziehenden Mittels, wie beispielsweise 2,4,6-Trimethyl- oder Triisopropylbenzolsulfonylchlor, -imidazol, -tetrazol oder -1,2,4-triazol gegebenenfalls substituiert durch Nitro. Besonders bevorzugt ist 1-(2,4,6-Trimethylbenzolsulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (XII).

Die besonders bevorzugte Kombination, darin bestehend, dass als Schutzgruppe R¹ die 4-Methoxytritylgruppe verwendet, zur Abspaltung von R¹ Zinkbromid in Gegenwart von 1,2,4-Triazol eingesetzt und als wasserentziehendes Mittel für die Reaktion von entschütztem Oligonukleotid-Polystyrol-Harz der Formel XIII mit einem entschützten Trinukleotid der Formel XI das Triazol der Formel XII verwendet wird, ermöglicht es, dass überraschenderweise auch lange Nukleotidketten mit etwa 40 bis etwa 70 Basen in kurzer Zeit, in hohen Ausbeuten und mit hoher Reinheit hergestellt werden können.

Zur erfindungsgemässen Abspaltung der Oligodesoxynukleotide vom Träger und zur Entfernung der Schutzgruppen gemäss Schritt d) werden an sich bekannte Verfahren verwendet. Besonders bevorzugtes Reagens zur Abspaltung vom Träger und zur Entfernung der bevorzugten 2-Chlorphenyl-Schutzgruppe ist ein Arylaldoximat, beispielsweise das 1,1,3,3-Tetramethylguanidinium-2-nitrobenzaldoximat. Die Reaktion erfolgt in einem der oben genannten inerten Lösungsmittel, dem etwas Wasser beigefügt wird, z.B. in 95%igem Pyridin, bei Raumtemperatur. Anschliessend wird mit wässrigem Ammoniak bei Raumtemperatur oder erhöhter Temperatur, z.B. bei 20°C bis 70°C, insbesondere bei 50°C, umgesetzt.

Zur Ligation der erfindungsgemäßen Oligodesoxynukleotide wird an der 5'-terminalen Hydroxygruppe ein Phosphatrest eingeführt. Die Einführung des Phosphatrestes (Phosphorylierung) erfolgt in an sich bekannter Weise mit Hilfe von T₄ Polynukleotid-Kinase in Gegenwart von ATP.

Erfindungsgemäß hergestellte Oligodesoxynukleotide aus dem kodierenden und dem komplementären DNA-Strang enthalten überlappende Sequenzen, bestehend aus mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15 überlappenden Basenpaaren. Solche Oligodesoxynukleotid-Paare werden beim Mischen durch Wasserstoffbrückenbindung zusammengehalten. Die überhängenden, einsträngigen Enden dienen gemäß Schritt e1) und e2) als Matrix (Templat) für den Aufbau des zweiten (komplementären) Stranges durch eine DNA-Polymerase, z.B. DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I oder T₄ DNA-Polymerase, oder mit AMV reverse Transcriptase, in Gegenwart der vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und TTP). Die bei der Komplementierung entstehenden Duplex-DNAs, bei denen es sich insbesondere um Fragmente des Desulfatohirudin-Gens (Verfahren e1) oder um das komplette Desulfatohirudin-Gen (Verfahren e2) handelt, besitzen flache Enden.

Die gemäß Verfahrensschritt e1) erhältlichen Fragmente des Desulfatohirudin-Gens enthalten an den Enden Nukleotidsequenzen, die von Restriktionsendonukleasen erkannt und gespalten werden können. Je nach Wahl der Nukleotidsequenzen und dementsprechend der Restriktionsendonukleasen entstehen bei der Spaltung vollständig basengepaarte (flache) Enden ("blunt ends") oder Enden mit einem überhängenden DNA-Strang ("staggered ends"). Die Restriktions-Erkennungssequenzen werden so gewählt, dass die Ligation der DNA-Fragmente, die mit einer flache Enden bildenden Restriktionsendonuklease behandelt worden sind, bzw die Basenpaarung der kohäsiven Enden und die anschliessende Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden DNA-Strängen das vollständige Desulfatohirudin-Strukturgewerbe ergibt. Die Ligierung zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente erfordert eine 5'-terminale Phosphatgruppe am Donor-Fragment und eine freie 3'-terminale Hydroxygruppe am Akzeptor-Fragment. Die in Schritt e1)

anfallenden DNA-Fragmente sind bereits 5'-terminal phosphoryliert und werden in an sich bekannter Weise mit einer Ligase, insbesondere T₄ DNA-Ligase, verknüpft.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden auf dem beschriebenen Wege zwei Fragmente des Desulfatohirudin-Gens, insbesondere die Fragmente F₁ und F₂ gemäss Formel III bzw. IV, hergestellt. Die Fragmente, welche erforderlichenfalls in einem geeignetem Vektor subkloniert werden können, enthalten vorzugsweise an den Verknüpfungsenden jeweils die Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease, insbesondere EcoRII, weswegen nach Spaltung mit besagtem Restriktionsenzym und Ligation der beiden Fragmente die korrekt kodierende Desulfatohirudin-DNA-Sequenz entsteht. Zusätzlich enthält das Teilstück 1 vor dem Translationsstartsignal (ATG) und das Teilstück 2 nach dem Translationsstop-signal (z.B. TAG) zusätzliche "terminale" Restriktionsstellen, die den Einbau des Desulfatohirudin-Gens bzw. der Desulfatohirudin-Gen-Fragmente in einen geeigneten Vektor erlauben.

Beispielsweise betrifft die Erfindung die Herstellung des Desulfatohirudin-Gens in zwei Teilstücken F₁ und F₂ der Formel III bzw. IV, welche gegebenenfalls subkloniert werden und nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym EcoRII und Ligation die korrekte Desulfatohirudin-DNA-Sequenz ergeben, und worin F₁ vor dem Translationsstartsignal eine EcoRI-Restriktionsstelle und F₂ nach dem Translationsstop-signal eine BamHI-Restriktionsstelle aufweist.

In einer bevorzugten Ausführungsform (Verfahren e2) werden je zwei Oligodesoxynukleotide, die alternativ aus dem kodierenden und aus dem komplementären Strang stammen, mittels mindestens 3, vorzugsweise 8 bis 15 komplementären Basen anelliert, mit einer DNAPolymerase, z.B. eine der oben genannten, aufgefüllt und mit T₄ DNA-Ligase zum Desulfatohirudin-Strukturgen ligiert.

Herstellung von Expressionsvektoren, welche ein für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierendes Gen enthalten

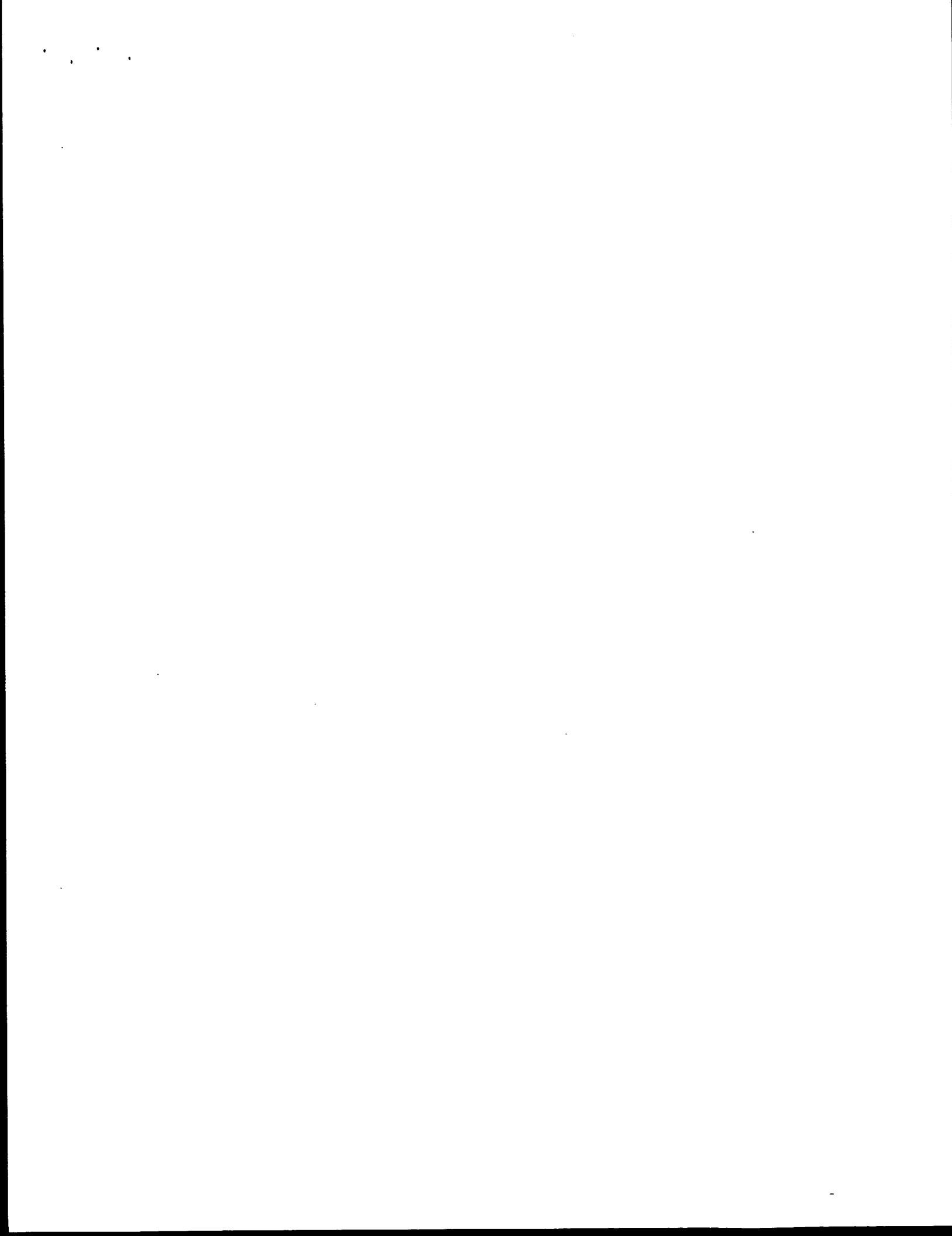
Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionsvektoren, welche eine für Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz enthalten, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, dass in einer mit diesen Expressionsvektoren transformierten Wirtszelle Polypeptide mit Hirudin-Aktivität exprimiert werden.

Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung werden z.B. hergestellt, indem man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, dass die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus der zur Transformation vorgesehenen Wirtszelle. Geeignete Werte sind beispielsweise Mikroorganismen, wie Hefen, z.B. Saccharomyces cerevisiae, und insbesondere Bakterienstämme, die über kein Restriktions- oder Modifikationsenzym verfügen, vor allem Stämme von Escherichia coli, z.B. E. coli X1776, E. coli HB101, E. coli W3110 Δ102, E. coli HB101/LM1035, E. coli JA221(30) oder E. coli K12 Stamm 294, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas, Haemophilus, Streptococcus und andere, ferner Zellen höherer Organismen, insbesondere etablierte humane oder tierische Zelllinien. Bevorzugte Wirtszellen sind die genannten Stämme von E. coli, insbesondere E. coli HB101, E. coli JA221 und E. coli W3110Δ102.

Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, welche die erfindungsgemässen heterologen, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierenden DNA-Sequenzen in dem gewählten Wirt replizieren und exprimieren.

Beispiele für Vektoren, die zur Expression des Desulfatohirudin-Gens in einem E. coli-Stamm geeignet sind, sind Bacteriophagen, z.B. Derivate des Bacteriophagen λ, oder Plasmide, wie insbesondere das Plasmid colE1 und seine Derivate, z.B. pMB9, pSF2124, pBR317 oder



pBR322. Die bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung leiten sich von Plasmid pBR322 ab. Geeignete Vektoren enthalten ein vollständiges Replicon und ein Markierungsgen, welches die Selektion und Identifizierung der mit den Expressionsplasmiden transformierten Mikroorganismen auf Grund eines phänotypischen Merkmals ermöglicht. Geeignete Markierungsgene verleihen dem Mikroorganismus beispielsweise Resistenz gegenüber Schwermetallen, Antibiotika und dergleichen. Weiterhin enthalten bevorzugte Vektoren der vorliegenden Erfindung ausserhalb der Replicon- und Markierungsgen-Regionen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, so dass an diesen Stellen die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz und gegebenenfalls die Expressions-Kontrollsequenz eingefügt werden können. Der bevorzugte Vektor, das Plasmid pBR322, enthält ein intaktes Replicon, gegen Tetracyclin und Ampicillin Resistenz verleihende Markierungsgene (tet^R und amp^R) und eine Reihe von nur einmal vorkommenden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, z.B. PstI (schneidet im amp^R -Gen, das tet^R -Gen bleibt intakt), BamHI, HindIII, SalI (schneiden alle im tet^R -Gen, das amp^R -Gen bleibt intakt), NruI und EcoRI.

Mehrere Expressionskontrollsequenzen können zur Regulation der Desulfatohirudin-Expression eingesetzt werden. Insbesondere werden Expressionskontrollsequenzen stark exprimierter Gene der zu transformierenden Wirtszelle verwendet. Im Falle von pBR322 als Hybridvektor und E. coli als Wirtsmikroorganismus sind beispielsweise die Expressionskontrollsequenzen (welche unter anderem den Promotor und die ribosomale Bindungsstelle enthalten) des Lactoseoperons, Tryptophanoperons, Arabinoseoperons und dergleichen, des β -Lactamasegens, die entsprechenden Sequenzen des Phage λ N-Gens oder des Phage fd-Schichtproteingens und andere geeignet. Während der Promotor des β -Lactamasegens (β -lac-Gen) bereits im Plasmid pBR322 enthalten ist, müssen die übrigen Expressionskontrollsequenzen in das Plasmid eingeführt werden. Bevorzugt als Expressionskontrollsequenz in der vorliegenden Erfindung ist diejenige des Tryptophanoperons (trp po).

Zur Replikation und Expression in Hefe geeignete Vektoren enthalten einen Hefe-Replikationsstart und einen selektiven genetischen Marker für Hefe. Hybridvektoren, die einen Hefe-Replikationsstart enthalten, z.B. das chromosomal autonom replizierende Segment (*ars*), bleiben nach der Transformation innerhalb der Hefezelle extra-chromosomal erhalten und werden bei der Mitose autonom repliziert. Ferner können Hybridvektoren, die der Hefe- 2μ -Plasmid-DNA homologe Sequenzen enthalten, verwendet werden. Solche Hybridvektoren werden durch Rekombination innerhalb der Zelle bereits vorhandenen 2μ -Plasmiden einverleibt oder replizieren autonom. 2μ -Sequenzen sind besonders für Plasmide mit grosser Transformationshäufigkeit geeignet und gestatten eine hohe Kopienzahl. Geeignete Markierungsgene für Hefe sind vor allem solche, die dem Wirt antibiotische Resistenz verleihen oder, im Fall von auxotrophen Hefemutanten, Gene, die Wirtsdefekte komplementieren. Entsprechende Gene verleihen z.B. Resistenz gegen das Antibiotikum Cycloheximid oder sorgen für Prototrophie in einer auxotrophen Hefemutante, z.B. das URA3-, LEU2-, HIS3- oder vor allem das TRP1-Gen. Vorzugsweise enthalten Hefe-Hybridvektoren weiterhin einen Replikationsstart und ein Markierungsgen für einen bakteriellen Wirt, insbesondere E. coli, damit die Konstruktion und die Klonierung der Hybridvektoren und ihrer Vorstufen in einem bakteriellen Wirt erfolgen kann. Für die Expression in Hefe geeignete Expressionskontrollsequenzen sind beispielsweise diejenigen des TRP1-, ADH1-, ADH11-, PHO3- oder PHO5-Gens, ferner im glykolytischen Abbau involvierte Promoter, z.B. der PGK- und der GAPDH-Promoter.

Insbesondere betrifft die Erfindung zur Replikation und phänotypischen Selektion befähigte Expressionsvektoren, welche eine Expressionskontrollsequenz und eine für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthalten, wobei besagte DNA-Sequenz mitsamt Transkriptionsstartsiegel und -terminationssignal sowie Translationsstartsiegel und -stopsignal in besagtem Expressionsplasmid unter Regulation besagter Expressionskontrollsequenz so angeordnet ist, dass in einer mit besagtem Expressionsplasmid transformierten Wirtszelle Desulfatohirudin exprimiert wird.

Um eine effektive Expression zu erreichen, muss das Desulfatohirudin-Gen richtig (in "Phase") mit der Expressionskontrollsequenz angeordnet sein. Es ist vorteilhaft, die Expressionskontrollsequenz in den Bereich zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem ATG der Genkodiersequenz, welche natürlich mit der Expressionskontrollsequenz verknüpft ist (z.B. die β -lac-Kodiersequenz bei Verwendung des β -lac-Promotors), mit dem Desulfatohirudin-Gen, welches vorzugsweise sein eigenes Translationsstartsignal (ATG) und Translationsstoppsignal (z.B. TAG) mitbringt, zu verknüpfen. Dadurch wird eine effektive Transkription und Translation gewährleistet.

Beispielsweise wird ein Vektor, insbesondere pBR322, mit einer Restriktionsendonuclease geschnitten und, gegebenenfalls nach Modifikation des so gebildeten linearisierten Vektors, eine mit entsprechenden Restriktionsenden versehene Expressionskontrollsequenz eingeführt. Die Expressionskontrollsequenz enthält am 3'-Ende (in Translationserichtung) die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuclease, sodass der die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltende Vektor mit besagtem Restriktionsenzym verdaut und das mit passenden Enden versehene Desulfatohirudin-Gen eingesetzt werden kann. Dabei entsteht ein Gemisch von zwei Hybridplasmiden, welche das Gen in richtiger bzw. in falscher Orientierung enthalten. Vorteilhaft ist es, den die Expressionskontrollsequenz bereits enthaltenden Vektor noch mit einer zweiten Restriktionsendonuclease innerhalb der Vektor-DNA zu spalten und in das entstandene Vektor-Fragment das mit richtigen Enden versehene Desulfatohirudin-Gen einzusetzen. Alle Operationen am Vektor erfolgen vorzugsweise in einer Weise, dass die Funktion des Replicons und zumindest eines Markierungsgens nicht beeinträchtigt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, welcher eine Expressionskontrollsequenz, insbesondere diejenige vom Tryptophan-Operon (trp po), enthält, die am 3'-Ende (zwischen dem Haupt-mRNA-Start und dem

ersten ATG) die Erkennungssequenz für eine, vorzugsweise kohäsive Enden bildende, Restriktionsendonuclease, z.B. EcoRI, trägt, mit der genannten Restriktionsendonuclease und im Vektor-DNA-Teil mit einer zweiten Restriktionsendonuclease, welche flache oder bevorzugt kohäsive Enden bildet, z.B. BamHI, verdaut, wonach der so linearisierte Vektor mit dem entsprechenden Enden aufweisenden Desulfatohirudin-Gen (z.B. mit einem EcoRI-Ende vor dem ATG-Start und einem BamHI-Ende nach dem Translationsstop-Codon) verknüpft wird. Die Verknüpfung erfolgt in bekannter Weise durch Paarung der komplementären (kohäsiven) Enden und Ligierung, z.B. mit λ -DNA-Ligase.

Das über den mRNA-Weg, aus genomicischer DNA oder synthetisch gewonnene, mit entsprechenden kohäsiven (insbesondere EcoRI- und BamHI-) Enden versehene Desulfatohirudin-Gen kann vor dem Einbringen in ein Expressionsplasmid auch in einen Vektor, z.B. pBR322, kloniert werden, um grössere Mengen an Desulfatohirudin-Gen, beispielsweise für die Sequenzanalyse, zu gewinnen. Die Isolierung der Klone, welche das Hybridplasmid enthalten, wird beispielsweise mit einer Desulfatohirudin-Gen-spezifischen, radioaktiv-markierten Oligodesoxynucleotid-Probe (siehe oben) durchgeführt. Die Charakterisierung des Desulfatohirudin-Gens erfolgt beispielsweise nach dem Verfahren von Maxam und Gilbert (11).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden zwei Teilstücke des Desulfatohirudin-Gens synthetisiert. Teilstück 1, welches den 1. Teil des Gens umfasst, enthält vor dem ATG und am Ende jeweils die Erkennungssequenz für kohäsive Enden bildende Restriktionsendonucleasen, z.B. vor dem ATG EcoRI und am Ende EcoRII. Teilstück 2, welches den hinteren Teil des Gens umfasst, besitzt entsprechende Erkennungssequenzen, am Anfang z.B. EcoRII und nach dem Translationsstopsignal (z.B. TAG) BamHI. Die Teilstücke werden an den äusseren Erkennungssequenzen gespalten (Teilstück 1 z.B. mit EcoRI und Teilstück 2 entsprechend mit BamHI) und in einen entsprechend zugeschnittenen Vektor (z.B. pBR322) subkloniert. Die Identifizierung der Klone, welche die Teilstücke enthalten, und die Charakterisierung der Teilstücke erfolgt wie oben beschrieben. Die

Teilstücke werden dann mit den entsprechenden Restriktionsendonucleasen aus den Hybridvektoren herausgeschnitten (Teilstück 1 z.B. mit EcoRI und EcoRII und Teilstück 2 z.B. mit EcoRII und BamHI) und über ihre kohäsiven Enden, insbesondere EcoRII-Enden, ligiert, wobei das komplette Desulfatohirudin-Gen entsteht, das wie angegeben in eine Vektor-DNA eingefügt wird.

Transformation der Mikroorganismen

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von transformierten Wirtszellen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Wirtszelle mit einem Expressionsvektor, der eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise die oben genannten Mikroorganismen, wie Stämme von Saccharomyces cerevisiae, Bacillus subtilis und insbesondere Escherichia coli. Die Transformation mit den erfindungsgemäßen Expressionsplasmiden erfolgt beispielsweise wie in der Literatur beschrieben, so für S. cerevisiae (12), B. subtilis (13) und E. coli (14). Die Isolierung der transformierten Wirtszellen erfolgt vorteilhaft aus einem selektiven Nährmedium, dem das Biocid zugesetzt wird, gegen welches das im Expressionsplasmid enthaltene Markierungs-Gen Resistenz verleiht. Wenn, wie bevorzugt, die Expressionsplasmide das amp^R -Gen enthalten, wird dem Nährmedium demgemäß Ampicillin zugesetzt. Zellen, welche das Expressionsplasmid nicht enthalten, werden in einem solchen Medium abgetötet.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die auf dem genannten Weg erhältlichen transformierten Wirtszellen.

Kultivierung der transformierten Wirtszellen und Gewinnung von Desulfatohirudinen

Die transformierten Wirtszellen können zur Herstellung von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität verwendet werden. Das Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen ist dadurch gekennzeichnet, dass die transformierten Wirtszellen kultiviert und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird.

Unter "Verbindungen mit Hirudin-Aktivität" werden solche, von den genannten transformierten Wirtszellen exprimierte Polypeptide verstanden, welche eine Thrombin-inhibierende Wirkung und eine positive Reaktion mit anti-Hirudin-Antikörpern zeigen und welche die Primärstruktur von Desulfatohirudin oder eine davon abgeleitete Struktur aufweisen. Unter Desulfatohirudin-Verbindungen mit einer von der Primärstruktur von Desulfatohirudin abgeleiteten Struktur werden modifizierte Desulfatohirudin-Verbindungen verstanden, wobei die Modifizierung vorzugsweise in einer Verkürzung der Primärstruktur des Desulfatohirudins, z.B. um 1 bis 10, insbesondere 1 bis 6, Aminosäurebausteine am N-Terminus und/oder um 1 bis 6, insbesondere 2, Aminosäurebausteine am C-Terminus oder in einer Modifizierung am N-Terminus, z.B. in einer N-terminalen Acetylierung oder Methionylierung, des Desulfatohirudin-Moleküls besteht.

Die Erfindung betrifft daher vor allem ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität und von Salzen solcher Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass mit einem Expressionsplasmid, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Wirtszellen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Produkt mit einem zur Aufspaltung der Disulfidbindungen geeigneten Reduktionsmittel versetzt und das erhältliche reduzierte Polypeptid mit einem zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen geeigneten Oxidationsmittel behandelt wird, und falls gewünscht, eine

erhältliche Hirudin-Verbindung in eine andere Hirudin-Verbindung überführt wird, und, falls gewünscht, ein verfahrensgemäss erhaltenes Gemisch von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird, und/oder, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Hirudin-Verbindungen der Formel

VValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluWLeuGln

(XIV),

worin V für Val oder für Met-Val steht und W Tyr oder Tyr(-OSO₃H) bedeutet, und von Salzen solcher Verbindungen.

Die Erfindung betrifft insbesondere Verfahren zur Herstellung von Desulfatohirudin der Formel XIV, worin V für Val und W für Tyr steht.

In den verfahrensgemäss erhaltenen Verbindungen mit Hirudin-Aktivität, insbesondere in den Verbindungen der Formel XIV, sind die Cystein-Reste Cys vorzugsweise in gleicher Anordnung wie im natürlichen Hirudin paarweise durch Disulfid-Brücken verknüpft.

Die Kultivierung der erfindungsgemässen transformierten Wirtszellen erfolgt in an sich bekannter Weise. So können für die Kultivierung der erfindungsgemässen, transformierten Wirtsmikroorganismen verschiedene Kohlenstoffquellen verwendet werden. Beispiele bevorzugter Kohlenstoffquellen sind assimilierbare Kohlenhydrate, wie Glucose, Maltose, Mannit oder Lactose, oder ein Acetat, das entweder allein oder in geeigneten Gemischen verwendet werden kann. Geeignete Stickstoffquellen sind beispielsweise Aminosäuren, wie Casamino-säuren, Peptide und Proteine und ihre Abbauprodukte, wie Trypton, Pepton oder Fleischextrakte; weiterhin Hefeextrakte, Malzextrakt,

wie auch Ammoniumsalze, z.B. Ammoniumchlorid, -sulfat oder -nitrat, die entweder allein oder in geeigneten Mischungen verwendet werden können. Anorganische Salze, die ebenfalls verwendet werden können, sind z.B. Sulfate, Chloride, Phosphate und Carbonate von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium.

Weiterhin enthält das Medium z.B. wachstumsfördernde Substanzen, wie Spurenelemente, z.B. Eisen, Zink, Mangan und dergleichen, und vorzugsweise Substanzen, die einen Selektionsdruck ausüben und das Wachstum von Zellen, die das Expressionsplasmid verloren haben, verhindern. So wird dem Medium beispielsweise Ampicillin zugesetzt, wenn das Expressionsplasmid ein amp^R -Gen enthält. Ein solcher Zusatz von antibiotisch wirksamen Substanzen bewirkt auch, dass kontaminierende, Antibiotika-empfindliche Mikroorganismen abgetötet werden.

Die Kultivierung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren. Die Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert des Mediums und Fermentationszeit, werden so ausgewählt, dass maximale Hirudin-Titer erhalten werden. So wird ein E. coli- oder ein Hefe-Stamm bevorzugt unter aeroben Bedingungen in submerser Kultur unter Schütteln oder Röhren bei einer Temperatur von etwas 20 bis 40°C, vorzugsweise etwa 30°C, und einem pH-Wert von 4 bis 9, vorzugsweise bei pH 7, während etwa 4 bis 20 h, vorzugsweise 8 bis 12 h, kultiviert. Dabei sammelt sich das Expressionsprodukt intrazellulär an.

Wenn die Zelldichte einen ausreichenden Wert erreicht hat, wird die Kultivierung abgebrochen und das Produkt aus den Zellen des Mikroorganismus freigesetzt. Zu diesem Zweck werden die Zellen zerstört, z.B. durch Behandlung mit einem Detergens, wie SDS oder Triton, oder mit Lysozym oder einem gleichartig wirkenden Enzym lysiert. Alternativ oder zusätzlich kann man mechanische Kräfte, wie Scherkräfte (z.B. X-Presse, French-Presse, Dyno-Mill) oder Schütteln mit Glasperlen oder Aluminiumoxid, oder abwechselndes Einfrieren, z.B. in flüssigem Stickstoff, und Auftauen, z.B. auf 30° bis 40°C, sowie Ultraschall zum Brechen der Zellen anwenden. Die resultierende Mischung, die Proteine, Nucleinsäuren und andere Zellbestandteile

enthält, wird nach der Zentrifugation in an sich bekannter Weise an Proteinen angereichert. So wird z.B. der grösste Teil der Nicht-Protein-Bestandteile durch Polyäthylenimin-Behandlung abgetrennt und die Proteine einschliesslich der Hirudin-Verbindungen z.B. durch Sättigen der Lösung mit Ammoniumsulfat oder mit anderen Salzen ausgefällt. Bakterielle Proteine können auch mittels Ansäuern mit Essigsäure (z.B. 0,1 %, pH 4-5) ausgefällt werden. Eine weitere Anreicherung an Hirudin-Verbindungen kann durch Extraktion des essigsauren Ueberstandes mit n-Butanol erreicht werden. Weitere Reinigungsschritte umfassen beispielsweise chromatographische Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, Gelpermeationschromatographie, Partitionschromatographie, HPLC, Umkehrphasen-HPLC und dergleichen. So erfolgt die Auftrennung der Mischbestandteile durch Dialyse, nach Ladung mittels Gel- oder trägerfreier Elektrophorese, nach Molekülgrösse mittels einer geeigneten Sephadex-Säule, durch Affinitätschromatographie, z.B. mit Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, oder mit Thrombin gekuppelt an einen geeigneten Träger zur Affinitätschromatographie, oder durch weitere, insbesondere aus der Literatur bekannte Verfahren.

Beispielsweise umfasst die Isolierung der exprimierten Hirudin-Verbindungen die folgenden Stufen:

Abtrennung der Zellen aus der Kulturlösung mittels Zentrifugation; Herstellung eines Rohextrakts durch Zerstören der Zellen, z.B. durch Behandlung mit einem lysierenden Enzym und/oder abwechselndem Einfrieren und Wiederauftauen; Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile; Ausfällen der DNA durch Zugabe von Polyäthylenimin; Fällung der Proteine durch Ammoniumsulfat; Affinitätschromatographie des gelösten Niederschlags an einer monoklonalen Anti-Desulfatohirudin-Antikörper-Säule oder einer Thrombin-Säule; Entsalzung der so gewonnenen Lösung mittels Dialyse oder Chromatographie an Sephadex G25 oder Sephadex G10.

Alternativ können nach Abtrennen der DNA die bakteriellen Proteine mittels 1%iger Essigsäure ausgefällt werden, aus dem sauren Überstand die Hirudin-Verbindung mit n-Butanol extrahiert oder der saure Überstand direkt der Ionenaustausch-Chromatographie (z.B. an Diäthylaminoäthylcellulose DEAE 53) unterworfen werden. Weitere Reinigungsstufen schliessen Gelfiltration an Sephadex G50 (oder G75), und Umkehrphasen-HPLC ein. Entsalzung erfolgt wieder an Sephadex G25.

Zum Nachweis der Hirudin-Aktivität kann der Test mit Anti-Hirudin- oder Anti-Desulfotohirudin-Antikörpern (z.B. aus Kaninchen erhältliche, oder aus Hybridomazellen erhältliche monoklonale Antikörper), der Thrombin-Test (15) oder der Blutgerinnungstest (16) herangezogen werden.

Verfahrensgemäß erhältliche Hirudin-Verbindungen können in an sich bekannter Weise in andere Hirudin-Verbindungen überführt werden.

So können z.B. Verbindungen der Formel XIV, worin W für Tyr steht, durch Umsetzen mit einer Tyrosin-Sulfotransferase, welche z.B. aus Egelzellen erhältlich ist, in Verbindungen der Formel XIV überführt werden, worin W für Tyr (-OSO₃H) steht.

Ferner können z.B. Verbindungen der Formel XIV, worin V für Met-Val steht, in Verbindungen der Formel XIV übergeführt werden, worin V Val bedeutet. Beispielsweise können erfahrungsgemäß erhältliche Hirudin-Verbindungen mit einem N-terminalen Methionylrest in entsprechende Verbindungen ohne N-terminalen Methionylrest übergeführt werden, indem man den terminalen Methionylrest in üblicher Weise mittels Bromcyan abspaltet. Die Reaktion mit Bromcyan erfolgt z.B. in einem wässrig-sauren Medium, z.B. in stark verdünnter Salzsäure, beispielsweise in 0,1-0,3 N Salzsäure, oder in einer starken organischen Säure, z.B. in 50-70%iger Ameisensäure, bei

Raumtemperatur oder geringfügig erhöhte oder erniedrigter Temperatur, z.B. bei ca. 15° bis etwa 25°C. über einen Zeitraum von etwa 24 Stunden.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Unversehrtheit der Disulfidbrücken für die gerinnungshemmende Aktivität von natürlichem Hirudin von Bedeutung ist (vgl. Lit. 2). Je nach Wahl der Wirtszelle kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verknüpfung der sechs Cystein-Reste im primären Translationsprodukt unter Bildung der drei Disulfidbrücken in einer Weise erfolgt, die sich vom natürlichen, in Egelzellen ablaufenden Vorgang unterscheidet. Es ist möglich, dass die sich einstellende "falsche" Tertiärstruktur des Produktes eine Verminderung oder sogar den Verlust der wertvollen pharmakologischen Eigenschaften, insbesondere der gerinnungshemmenden Aktivität, zur Folge hat, was sich mit Hilfe der oben genannten Hirudin-Assays (z.B. Thrombin-Test) feststellen lässt. In einem solchen Fall ist es zweckmäßig, die Disulfidbindungen mit einem geeigneten Reduktionsmittel zu spalten und das reduzierte Polypeptid zur Neuknüpfung der Disulfidbindungen mit einem geeigneten Oxidationsmittel zu behandeln. Anhand der Hirudin-Aktivität des gebildeten Produktes (z.B. im Thrombin-Test) lässt sich feststellen, ob die gewählten Bedingungen (Reduktions-und/oder Oxidationsmittel) zum gewünschten biologisch aktiven Hirudin geführt haben oder ob die Bedingungen in bekannter Weise modifiziert werden müssen.

Zur Aufspaltung von Disulfidbindungen geeignete Reduktionsmittel sind beispielsweise Thiol-Verbindungen, wie Thiophenol, 4-Nitrothiophenol, 1,4-Butandithiol und insbesondere 1,4-Dithiothreitol. Die Reduktion wird vorteilhaft in einem wässrig-alkalischen Medium, beispielsweise in der verdünnten wässrigen Lösung eines Alkalimetallhydroxids, z.B. Natriumhydroxid, Alkalimetallcarbonats, z.B. Natriumcarbonats, oder einer organischen Base, insbesondere eines Triniederalkylamins, z.B. Triäthylamin, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Oxidationsmittel, welche zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen in den reduzierten Polypeptiden geeignet sind, sind beispielsweise Luftsauerstoff, welcher durch eine wässrige Lösung des Polypeptids, der gegebenenfalls eine katalytische Menge eines Übergangsmetallsalzes, z.B. Eisen-(III)-sulfat, Eisen-(III)-chlorid oder Kupfer(II)-sulfat, beigefügt wurde, geleitet wird; Jod, auch in Form des Kaliumjodid-Adduktes KJ_3 , welches vorzugsweise in alkoholischer, z.B. methanolischer, oder wässrig-alkoholischer, z.B. wässrig-methanolischer, Lösung eingesetzt wird; Kaliumhexacyanoferrat-(III) in wässriger Lösung; 1,2-Dijodäthan oder Azodicarbonsäuredimethyl-ester oder -diäthylester, welche in Wasser oder in einer Mischung bestehend aus Wasser und einem mit Wasser mischbaren Alkohol, z.B. Methanol, zur Reaktion gebracht werden. Die Oxidation wird insbesondere bei Raumtemperatur ausgeführt.

Die Abtrennung der Reagentien, insbesondere der Salze und der Oxidations- bzw. der Reduktionsmittel und ihrer Folgeprodukte, von der gewünschten Hirudin-Verbindung erfolgt nach an sich bekannten Methoden, beispielsweise durch Molekulargewichtsfiltration, z.B. an Sephadex oder Biogel.

Ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität kann in an sich bekannter Weise in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden. Geeignete Trennverfahren sind beispielsweise chromatographische Verfahren, z.B. Adsorption-Chromatographie, Ionenaustauschchromatographie, HPLC oder reversed-phase HPLC, ferner multiplikative Verteilung oder elektrophoretische Methoden, z.B. Elektrophorese an Celluloseacetat oder Gelelektrophorese, insbesondere Polyacrylamid-Gelelektrophorese ("PAGE").

Die Erfindung betrifft weiterhin die erfindungsgemäß erhältlichen neuen Desulfatohirudin-Verbindungen, insbesondere solche der Formel XIV, worin V Met-Val ist und W die angegebenen Bedeutungen hat, und Salze davon.

Die Erfindung betrifft ferner neue Desulfatohirudin-Verbindungen, welche durch RP-HPLC-Konstanten [Bedingungen: Vydac 218TP5415; 4,6 x 150 mm; Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07 % Trifluoressigsäure. Gradient: 2 min 16 % B, dann während 3 min. auf 20 % B steigern, dann während 15 min auf 25 % B steigern, dann während 27 min. auf 64 % B steigern], FPLC-Konstanten [Bedingungen: Mono Q-Säule (Pharmacia), 4,6mm x 150 mm. Puffer A: 20 mM Tris • HCl pH 7,5; Puffer B: 20 mM Tris • HCl/1 M NaCl. Linearer Salzgradient: A: während 9 ml mit 15 % Puffer B eluieren, während 10,7 ml auf 70 % Puffer B steigern] und UV-Absorption wie folgt charakterisiert sind:

Verbindung A: RP-HPLC, Retentionszeit 16,83 min;
FPLC; Elution bei 390 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$;
Verbindung B: RP-HPLC: Retentionszeit 18,43 min;
Verbindung C: RP-HPLC: Retentionszeit 19,6 min;
FPLC: Elution bei 420 mM NaCl;
Verbindung D: RP-HPLC: Retentionszeit 20,6 min;
FPLC: Elution bei 460 mM NaCl;
Verbindung E: RP-HPLC: Retentionszeit 21,53 min; FPLC:
Elution bei 500 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$;

und das Verfahren zu ihrer Herstellung mittels der transformierten Wirtsstämme.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen bzw. die neuen Verbindungen, z.B. der Formel XIV, können nicht nur in freier Form, sondern auch in Form ihrer Salze, insbesondere ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, vorliegen. Da sie mehrere Aminosäurereste mit freien Aminogruppen enthalten, können die erfindungsgemässen Verbindungen z.B. in Form von Säureadditionssalzen vorliegen. Als Säureadditionssalze kommen insbesondere physiologisch verträgliche Salze mit üblichen, therapeutisch anwendbaren Säuren in Betracht; als anorganische Säuren sind die Halogenwasserstoffsäuren, wie die Chlorwasserstoffsäure, aber auch Schwefelsäure und Phosphor- bzw. Pyrophosphorsäure zu nennen; als organische Säuren sind in erster

Linie Sulfonsäuren, wie die Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure oder Niederalkansulfonsäuren, wie Methansulfonsäure, sowie Carbonsäuren, wie Essigsäure, Milchsäure, Palmitin- und Stearinsäure, Aepfelsäure, Weinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure, geeignet. Da die Hirudin-Verbindungen auch Aminosäurereste mit freien Carboxylgruppen enthalten, können sie auch als Metallsalz, insbesondere als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalz, z.B. Natrium-, Kalium-, Calcium- oder Magnesiumsalz, oder auch als Ammoniumsalz, abgeleitet von Ammoniak oder einer physiologisch verträglichen, organischen stickstoffhaltigen Base, vorliegen. Da sie aber zugleich freie Carboxylgruppen und freie Aminogruppen enthalten, können sie auch als inneres Salz vorliegen.

Je nach Arbeitsweise erhält man die erfindungsgemäßen Verbindungen in freier Form, in Form von Säureadditionssalzen oder Salzen mit Basen. Aus den Säureadditionssalzen und den Salzen mit Basen können in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Einstellen des pH-Wertes auf den isoelektrischen Punkt, die freien Verbindungen gewonnen werden. Von letzteren wiederum lassen sich durch Umsetzen mit Säuren bzw. Basen, z.B. mit solchen, die die obengenannten Salze bilden, und Eindämpfen oder Lyophilisieren therapeutisch annehmbare Säureadditionssalze bzw. Salze mit Basen gewinnen.

Monoklonale Antikörper gegen Desulfatohirudin und Test-Kits, die solche Antikörper enthalten.

Die Eigenschaft von Antikörpern, spezifische Antigene zu binden, findet ausserhalb des Körpers praktische Anwendung bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung (Immuno-Assay) und bei der Reinigung der Antigene (Immunoaffinitätschromatographie). Serum immunisierter Tiere enthält normalerweise eine Vielzahl verschiedener Antikörper, die mit dem gleichen Antigen an verschiedenen Bindungsstellen mit verschiedener Affinität reagieren, dazu aber auch Antikörper gegen andere Antigene, die die früheren Erfahrungen des Individuums widerspiegeln. Die erfolgreiche Anwendung von Antikörpern zur Bestimmung und Reinigung von Antigenen erfordert aber hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit.

Homogene Antikörper, die diese Anforderungen erfüllen, sind durch die von Köhler und Milstein (17) beschriebene Hybridoma-Technik zugänglich geworden. Prinzipiell besteht die Technik darin, dass Antikörper ausscheidende B-Lymphozyten, z.B. aus der Milz, immunisierter Tiere mit Tumorzellen verschmolzen ("fusioniert") werden. Die gebildeten Hybridoma-Zellen kombinieren die Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung durch Teilung mit der Fähigkeit, einen einheitlichen Typ Antikörper zu bilden und auszuscheiden. Durch Kultivierung in einem selektiven Medium, in dem nicht fusionierte Tumorzellen absterben, Hybridoma-Zellen sich aber vermehren, und durch geeignete Manipulationen können Klone, d.h. Zellpopulationen, die sich von einer einzigen Hybridoma-Zelle ableiten und genetisch identisch sind, gewonnen und kultiviert und die durch die Zellen produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen Desulfatohirudin und Hirudin, Hybridomazellen, die solche Antikörper produzieren und Verfahren zu ihrer Herstellung. Bevorzugt sind Hybridomazelllinien und die von diesen ausgeschiedene monoklonale Antikörper, die spezifisch mit Desulfatohirudin oder Hirudin reagieren. Das Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Anti-Desulfatohirudin-und Anti-Hirudin-Antikörpern ist dadurch gekennzeichnet, dass man Mäuse mit Desulfatohirudin oder Hirudin immunisiert, B-Lymphozyten derart immunisierter Tiere mit Myelomazellen fusioniert, die gebildeten Hybridomazellen kloniert, dann in vitro oder durch Injektion in Mäusen kultiviert und aus den Kulturen Antikörper isoliert.

Die Erfindung betrifft ferner Immuno-Affinitätschromatographie-Säulen und Test-Kits für Immunoassays, die diese Antikörper enthalten.

Nach dem erfindungsgemässen Verfahren werden Mäuse, z.B. Balb/c-Mäuse, auf an sich bekannte Weise immunisiert. Ueberraschenderweise gelingt die Immunisierung, obwohl Desulfatohirudin und Hirudin

verhältnismässig kleine Protein-Moleküle sind. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Desulfatohirudin bzw. Hirudin etwa wöchentlich oder auch in grösseren Abständen während mehreren Wochen, beispielsweise 5 bis 12 Wochen, injiziert, bis sich eine genügende Zahl Antikörper-produzierender B-Lymphozyten gebildet hat.

B-Lymphozyten enthaltende Organe, z.B. Milzzellen, der immunisierten Mäuse werden entnommen und mit solchen Myelomazellen fusioniert, die aufgrund einer Mutation in einem selektiven Kulturmedium nicht wachsen. Solche Myelomazellen sind bekannt und sind beispielsweise jene mit der Bezeichnung X63-Ag8, X63-Ag8.6.5.3, MPC-11, NS1-Ag4/1, MOPC-21 NS/1 oder SP 2/0. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomazellen der Zell-Linie X63-Ag8.6.5.3 fusioniert.

Die Fusion wird nach an sich bekannten Verfahren durch Mischen der B-Lymphozyten und der Myelomazellen unter Zugabe eines Zellfusionsagens, wie Polyethylenglykol, Sendai-Virus, Calciumchlorid oder Lysolecithin durchgeführt. Vorzugsweise wird in Gegenwart von Polyethylenglykol, beispielsweise mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 4000, fusioniert. Nach der Fusion werden die entstandenen Hybride nach einem an sich bekannten Verfahren in einem selektiven Kulturmedium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) komplementiert ist, kultiviert. Nicht fusionierte Myelomazellen können in diesem Medium nicht wachsen und sterben ebenso wie normale Lymphozyten.

Die Ueberstände der Hybridoma-Kulturen können mit an sich bekannten Verfahren auf ihren Gehalt an spezifischen Antikörpern geprüft werden, beispielsweise mit Radio-Immunoassay oder Agglutinierung. Dabei wird überraschenderweise festgestellt, dass mit dem beschriebenen Verfahren Hybridoma-Zellen gewonnen werden können, die Antikörper spezifisch gegen Desulfatohirudin oder Hirudin ausscheiden.

Die Hybridomazellen, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, werden aus dem aus der Fusionierung hervorgegangenen Gemisch verschiedenster Hybridomazellen durch Klonieren heraus-selektioniert. Dazu werden nach einem an sich bekannten Verfahren, das "limiting dilution" genannt wird, Kulturen ausgehend von einer einzigen wachsenden Zelle angesetzt.

Zur Massenproduktion werden die Hybridoma-Zellklone, die Antikörper der gewünschten Spezifität produzieren, entweder in an sich bekannten Medien in vitro kultiviert oder zur Vermehrung in Mäuse injiziert. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Hybridomazellen in mit Pristan vorbehandelte Mäuse injiziert, Aszites-Flüssigkeit entnommen und daraus durch Fällung mit Ammoniumsulfat-Lösung Antikörper isoliert.

Die mit Hilfe dieser Hybridomazellen gewonnenen Desulfatohirudin- und Hirudin-spezifischen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Immuno-Affinitätschromatographie-Säulen verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein geeignetes Trägermaterial (suspendiert in einer Pufferlösung) mit einer Antikörper-Lösung versetzt, ungebundene Anteile werden anschliessend ausgewaschen und unbesetzte Stellen des Trägermaterials blockiert.

Die mit Hilfe der Hybridomazellen gewonnenen Desulfatohirudin- und Hirudin-spezifischen Antikörper können auf an sich bekannte Weise für die Herstellung von Test-Kits verwendet werden. Diese Test-Kits können auf verschiedenen Methoden beruhen, beispielsweise auf Radio-Immunodiffusion, Latex-Agglutinierung, Tüpfel-Tests, Kompetitive oder Sandwich-Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay, Immuno-Fluoreszenz oder immunochemischen Enzym-Tests. Solche Kits können neben gewöhnlichen Antikörpern verschiedener Herkunft Antikörper-Konjugate mit Enzymen oder Fluoreszenzträgern enthalten, dazu Desulfatohirudin oder Hirudin markiert mit radioaktiven Isotopen wie J¹²⁵, oder konjugiert mit Enzymen, beispielsweise mit Meerrettich-

Peroxidase oder alkalischer Phosphatase, ferner Enzymsubstrate, geeignete Puffer, Gele, Latex, Polystyrol oder andere Füllmaterialien und Träger.

Pharmazeutische Präparate

Die gemäss der vorliegenden Erfindung erhältlichen bekannten ("natürliches" Hirudin) und neuen (z.B. Desulfatohirudin) Hirudine weisen wertvolle pharmakologische Eigenschaften auf und können, wie aus Blutegeln extrahiertes Hirudin, prophylaktisch oder insbesondere therapeutisch angewendet werden.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Desulfatohirudin-Verbindungen erweisen sich hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität als zumindest äquivalent zu natürlichem Hirudin. So weist beispielsweise Desulfatohirudin einen K_i -Wert von ca. 10^{-11} M auf. Desulfatohirudin ist vollständig spezifisch für Thrombin und zeigt keinerlei Wechselwirkungen mit anderen Proteinasen des Blutgerinnungssystems. Die aktive Toxizität ist äusserst gering; so sind in der Ratte bei Dosen von z.B. 1 g/kg keinerlei toxische Anzeichen festzustellen. Desgleichen werden keinerlei Hypersensitivitäts- und Allergie-Reaktionen beobachtet.

Die erfindungsgemässen neuen Desulfatohirudin-Verbindungen können daher in Analogie zu natürlichem Hirudin zur Therapie und Prophylaxe von Thrombosen und Thromboembolien, einschliesslich zur Prophylaxe von postoperativen Thrombosen, zur akuten Schock-Therapie (z.B. bei septischem oder polytraumatischem Schock), zur Therapie von Verbrauchskoagulopathien, bei Hämodialysen, Hämoseparationen und im extrakorporalen Kreislauf verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, welche wenigstens eine der erfindungsgemässen Verbindungen oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen, enthalten.

Diese Zusammensetzungen können insbesondere bei den oben angegebenen Indikationen Verwendung finden, wenn sie z.B. parenteral, wie intravenös, intracutan, subcutan oder intramuskulär, oder topisch verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen neuen Verbindungen und diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen für die prophylaktische und therapeutische Behandlung des menschlichen und tierischen Körpers, insbesondere bei den oben angegebenen Krankheitsbildern, in erster Linie zur Hemmung der Gerinnung des Blutes innerhalb und ausserhalb des menschlichen und tierischen Körpers.

Die Dosierung hängt in erster Linie von der spezifischen Verabreichungsform und vom Zweck der Therapie bzw. Prophylaxe ab. Die Grösse der Einzeldosen sowie das Verabreichungsschema kann am besten anhand einer individuellen Beurteilung des jeweiligen Krankheitsfalles bestimmt werden; die dazu erforderlichen Methoden zur Bestimmung von relevanten Blutfaktoren sind dem Fachmann geläufig. Im Normalfall liegt bei einer Injektion die therapeutisch wirksame Menge der erfindungsgemäßen Verbindungen im Dosisbereich von etwa 0,005 bis etwa 0,1 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt wird der Bereich von etwa 0,01 bis etwa 0,05 mg/kg Körpergewicht. Die Verabreichung erfolgt durch intravenöse, intramuskuläre oder subcutane Injektion. Dementsprechend enthalten pharmazeutische Präparate zur parenteralen Verabreichung in Einzeldosis-Form in Abhängigkeit von der Applikationsart pro Dosis etwa 0,4 bis etwa 7,5 mg der erfindungsgemäßen Verbindung. Neben dem Wirkstoff enthalten diese pharmazeutischen Zusammensetzungen üblicherweise noch einen Puffer, z.B. einen Phosphatpuffer, der den pH-Wert zwischen etwa 3,5 und 7 halten soll, und ferner Natriumchlorid, Mannit oder Sorbit zur Einstellung der Isotonie. Sie können in gefriergetrockneter oder gelöster Form vorliegen, wobei Lösungen mit Vorteil ein antibakteriell wirkendes Konservierungsmittel, z.B. 0,2 bis 0,3 % 4-Hydroxybenzoësäure-methylester oder -ethylester, enthalten können.

Ein Präparat für die topische Anwendung kann als wässrige Lösung, Lotion oder Gelee, ölige Lösung oder Suspension, oder fetthaltige oder insbesondere Emulsions-Salbe vorliegen. Ein Präparat in Form einer wässrigen Lösung erhält man beispielsweise dadurch, dass man die erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder ein therapeutisch annehmbares Salz davon in einer wässrigen Pufferlösung von pH 4 bis 6,5 löst und gewünschtenfalls einen weiteren Wirkstoff, z.B. ein Antiinflammatorikum, und/oder ein polymeres Haftmittel, z.B. Polyvinylpyrrolidon, und/oder ein Konservierungsmittel zufügt. Die Konzentration des Wirkstoffs beträgt etwa 0,1 bis etwa 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in 10 ml einer Lösung bzw. 10 g eines Gelees.

Eine ölige Applikationsform für die topische Verabreichung erhält man beispielsweise durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder eines therapeutisch annehmbaren Salzes davon in einem Öl, gegebenenfalls unter Zusatz von Quellmitteln, wie Aluminiumstearat, und/oder grenzflächenaktiven Mitteln (Tensiden), deren HLB-Wert ("hydrophilic-lipophilic-balance") unter 10 liegt, wie Fettsäuremonoester mehrwertiger Alkohole, z.B. Glycerinmonostearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonostearat oder Sorbitanmonooleat. Eine fetthaltige Salbe erhält man z.B. durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer streichbaren Fettgrundlage, gegebenenfalls unter Zusatz eines Tensids vom HLB-Wert unter 10. Eine Emulsionssalbe erhält man durch Verreiben einer wässrigen Lösung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe oder deren Salze in einer weichen, streichbaren Fettunterlage unter Zusatz eines Tensids, dessen HLB-Wert unter 10 liegt. Alle diese topischen Applikationsformen können auch Konservierungsmittel enthalten. Die Konzentration des Wirkstoffs beträgt etwa 0,1 bis etwa 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in etwa 10 g der Grundmasse.

Neben den oben beschriebenen und ihnen analogen pharmazeutischen Zusammensetzungen, welche für einen direkten medizinischen Einsatz am Körper des Menschen oder eines Säugetieres bestimmt sind, betrifft die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen und Präparate zur medizinischen Anwendung ausserhalb des

lebenden Körpers des Menschen oder der Säugetiere. Solche Zusammensetzungen und Präparate verwendet man in erster Linie als gerinnungshemmenden Zusatz zu Blut, welches ausserhalb des Körpers einer Zirkulation oder Behandlung (z.B. extrakorporaler Kreislauf oder Dialyse in künstlichen Nieren), Konservierung oder Modifizierung (z.B. Hämoseparation) unterzogen wird. In ihrer Zusammensetzung sind derartige Präparate, wie Vorratslösungen oder auch Zubereitungen in Einzeldosis-Form, den oben beschriebenen Injektionspräparaten ähnlich; zweckmässigerweise wird aber die Wirkstoffmenge bzw. -konzentration auf das Volumen des zu behandelnden Blutes oder, noch exakter, auf dessen Thrombingehalt bezogen. Dabei ist zu beachten, dass die erfundungsgemässen Wirkstoffe (in freier Form) eine etwa 5fache Gewichtsmenge Thrombin völlig desaktivieren, auch in grösseren Mengen physiologisch harmlos sind, und vom zirkulierenden Blut auch in hohen Konzentrationen sehr schnell ausgeschieden werden, so dass keine Gefahr einer Ueberdosierung, auch z.B. bei Transfusionen, besteht. Je nach dem spezifischen Zweck beträgt die geeignete Dosis etwa 0,01 bis etwa 1,0 mg Wirkstoff/l Blut, wobei die obere Grenze ohne Gefahr noch überschritten werden darf.

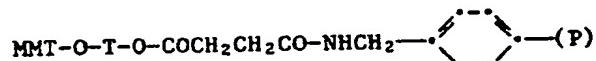
Insbesondere betrifft die Erfindung die in den Beispielen beschriebenen, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierenden DNA-Sequenzen, solche DNA-Sequenzen enthaltende Expressionsplasmide, mit solchen Expressionsplasmiden transformierte Mikroorganismen, monoklonale Antikörper gegen Hirudin, Hybridoma-Zellen, die solche Antikörper produzieren, und Test-Kits für Immunoassays, die solche Antikörper enthalten, die in den Beispielen beschriebenen Verfahren zu ihrer Herstellung und das in den Beispielen beschriebene Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität mit Hilfe der transformierten Mikroorganismen, sowie die in den Beispielen beschriebenen neuen Desulfatohirudin-Verbindungen.

Die folgenden Beispiele und Zeichnungen dienen zur Illustration der Erfindung und sollen sie in keiner Weise einschränken.

Experimenteller Teil

Die in den Beispielen verwendeten Abkürzungen haben die folgende Bedeutung:

TNE	Lösung, die 100 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl pH 7.5 und 5 mM EDTA enthält,
SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol (1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)
BSA	Rinder-Serumalbumin
EtBr	Ethidiumbromid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris·HCl	Monohydrochlorid von Tris

Beispiel 1: Herstellung des geschützten Nucleosid-Polystyrol-Harzes

2,57 g (5 mMol) 5'-(4-Methoxytrityl)-thymidin (MMT-O-T-OH) in 20 ml abs. Pyridin werden mit 750 mg Bernsteinsäureanhydrid und 910 mg 4-Dimethylaminopyridin versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach Einengen der Pyridin-Lösung wird in 200 ml Essigsäureäthylester aufgenommen, zweimal mit je 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer unter Zusatz von 10 ml gesättigter Kochsalz-Lösung ausgeschüttelt, nochmals mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, getrocknet, eingeengt und Hexan zugetropft. Das ausgefallene Produkt wird abgetrennt und zweimal mit Aether zerrieben, dann in 300 ml Essigsäureäthylester gelöst und bei 0°C mit 180 ml 0,1 M Kaliumhydrogensulfat von pH 2,5 ausgeschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wird die Essigesterlösung mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert, mit 0,5 ml Pyridin versetzt, eingeengt und tropfenweise mit Hexan verdünnt. Das ausgefallene Bernsteinsäurederivat wird abfiltriert.

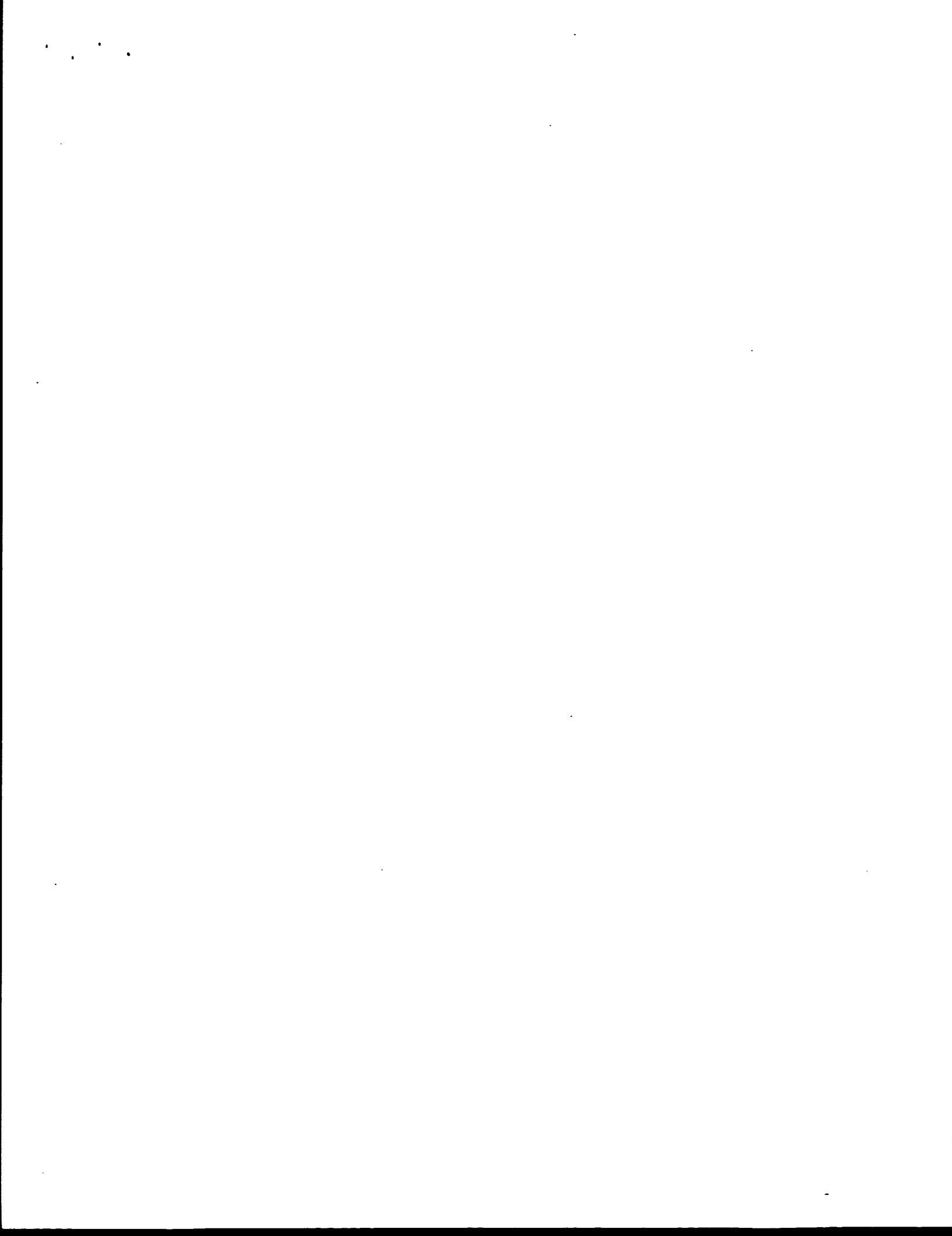
1,0 g dieser Verbindung werden zusammen mit 190 mg N-Hydroxysuccinimid in 4 ml Essigsäureäthylester und 2 ml Dimethylformamid gelöst und bei 0°C mit 370 mg N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach Stehen über Nacht im Kühlschrank wird der ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäureäthylester verdünnt, mit kaltem 0,1 M Natriumhydrogencarbonat und Wasser extrahiert, getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Essigsäureäthylester an Kieselgel chromatographiert. DC: R_f 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

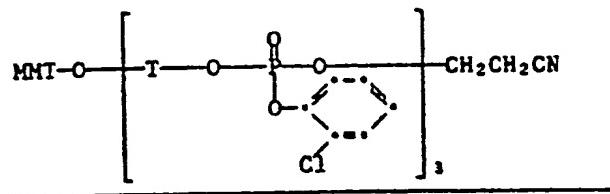
100 mg dieses N-Succinimidoyl-bernsteinsäureesters werden mit 1 g Aminomethyl-polystyrol (Amingehalt 110 $\mu\text{Mol/g}$) in 2 ml Dichlormethan und 4 ml Dimethylformamid 20 Stunden gerührt. Das Polymer-Harz wird abfiltriert und mit Dimethylformamid, Methanol, Dichlormethan und Methanol ausgewaschen. Nach dem Trocknen werden die nicht umgesetzten Aminogruppen acetyliert, indem das Harz in 6 ml Pyridin mit 1 ml Essigsäureanhydrid und 100 mg 4-Dimethylaminopyridin 30 min. gerührt wird. Das Polymer-Harz wird mit Dichlormethan, Dimethylformamid, Methanol und Dichlormethan ausgewaschen und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die spektroskopische Methoxytrityl (MMT)-Bestimmung ergibt eine Beladung von 57 $\mu\text{Mol/g}$.

Beispiel 2: Analog Beispiel 1 wird das folgende geschützte Nucleosid-Polystyrol-Harz hergestellt:



N-isobutyryl-deoxyguanosin, Beladung 32 $\mu\text{Mol/g}$.



Beispiel 3: Synthese des Trinukleotidsa) Synthese des Dinukleotids:

7,73 g (15 mMol) 5'-(4-Methoxytrityl)-thymidin (MMT-O-T-OH) werden zweimal mit abs. Pyridin eingedampft. Der Rückstand wird in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und zu 80 ml einer 0,2 M Lösung von 2-Chlorphenyl-di-(1-benzotriazolyl)-phosphat in Tetrahydrofuran unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss getropft und das Reaktionsgemisch 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Lösung des 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphats wird in drei Teile geteilt.

a) Hydrolyse zu Triethylammonium-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat:

Zu einem Drittel der obigen Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat werden unter Kühlung 100 ml 0,5 M Triäthylammoniumbicarbonat gegeben. Nach 15 min. wird mit Dichlormethan extrahiert. Die Dichlormethan-Lösung wird mit Wasser gewaschen, eingeengt und tropfenweise mit Petrolether versetzt. Die erhaltene Fällung wird abgenutscht, mit Aether-Petrolether 1:1 ausgewaschen und im Vakuum getrocknet. DC: R_f 0,35 in Dichlormethan-Methanol-Wasser (75:22:3).

b) Veresterung zu 2-Cyanoäthyl-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat und Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe:

Zu einem Drittel der Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-phosphat werden 1,3 ml 2-Cyanoäthanol und 2 ml Pyridin gegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei Raumtem-

peratur belassen. Die Lösungsmittel werden im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Essigsäureäthylester gelöst und mehrmals mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 und Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird getrocknet, eingeengt und in Hexan eingetropft. Der Niederschlag wird abfiltriert, in 50 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 gelöst und bei 0°C mit einer Lösung von 3,8 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 75 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 versetzt. Nach 2 Stunden wird die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und mit einer kalten Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird eingeengt und mit Hexan versetzt. Das ausgefallene 2-Cyanoethyl-2-chlorphenyl-thymidin-3'-phosphat wird an Kieselgel mit Dichlormethan-Methanol 96:4 chromatographiert.
DC: R_f von 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

γ) Kondensation zum 5'-(4-Methoxytrityl)-3'-cyanoäthyl)-bis-thymidin-dinukleotid:

2,2 g 2-Cyanoäthyl-2-chlorphenyl-thymidin-3'-phosphat werden zweimal durch Eindampfen mit abs. Pyridin entwässert, in 20 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und zum restlichen Drittel der Lösung von 2-Chlorphenyl-1-benzotriazolyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat gegeben. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur werden zur Reaktionslösung unter Eiskühlung 10 ml Wasser und 200 ml Essigsäureäthylester zugegeben. Die organische Phase wird mehrmals mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und auf ein kleines Volumen eingeengt. Das im Phosphat-Teil und am 5'- bzw. 3'-Ende geschützte Dinukleotid wird durch Eintropfen in Aether-Hexan 1:1 gefällt. DC: R_f 0,48 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

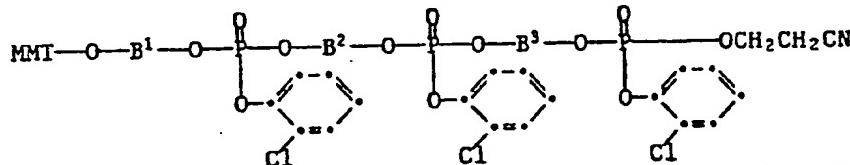
b) Synthese des Trinukleotids:

1,17 g (1 mMol) des oben beschriebenen vollgeschützten Dinukleotids werden in 30 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 gelöst und unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1,9 g p-Toluolsulfonsäuremonohydrat in 20 ml Dichlormethan-Methanol 7:3 versetzt. Nach 2 Stunden wird eiskalte Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet, eingeengt und in Hexan eingetropft. Das ausgefallene rohe Dinukleotid mit

freier 5'-Hydroxygruppe wird an Kieselgel mit einem Gradienten von 2-8 % Methanol in Dichlormethan chromatographiert. DC: R_f 0,33 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

850 mg dieses 5'-Hydroxy-dinukleotids und 1,06 g Triethylammonium-2-chlorphenyl-5'-(4-methoxytrityl)-thymidin-3'-phosphat [vgl. Abschnitt a)u)] werden zweimal mit Pyridin eingedampft, dann in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 560 mg 1-Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) versetzt. Nach 2 Stunden werden 2 ml eiskaltes Wasser zugegeben und nach einer weiteren Stunde mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, getrocknet, eingeengt und mit Aether versetzt. Das ausgefallene Trinukleotid wird durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt. R_f 0,45 in Dichlormethan-Methanol (9:1).

Beispiel 4: Analog Beispiel 3 werden folgende geschützte Trinukleotide der allgemeinen Formel



abgekürzt $B^1B^2B^3$, hergestellt. Für die Nukleoside B^1 , B^2 , B^3 werden folgende Abkürzungen verwendet:

A = N-Benzoyl-deoxyadenosin

C = N-Benzoyl-deoxycytidin

G = N-Isobutyryl-deoxyguanosin

T = Thymidin

Verbindung	R_f a)	Verbindung	R_f a)
TTT	0,45	ATG	0,48
TTC	0,55	ACT	0,53
TCT	0,46	ACC	0,48
TAC	0,56	ATT	0,55
TGC	0,44	ACA	0,53
TAG	0,60	AAC	0,46
TGT	0,42	AAA	0,51
TGA	0,44	AGT	0,45
CTT	0,53	AGG	0,38
CTG	0,46	GTT	0,45
CCT	0,45	GTC	0,44
CCC	0,59	GTG	0,35
CCG	0,47	GCA	0,49
CCA	0,51	GCG	0,48
CAT	0,55	GAT	0,44
CAC	0,51	GAC	0,48
CGC	0,46	GAG	0,48
CGA	0,38	GAA	0,50
CAG	0,44	GGC	0,42
CGG	0,38	GGT	0,46
CGT	0,49	GGG	0,35
		CGA	0,44

a) Dünnenschichtchromatogramm auf Kieselgel in Dichlormethan-Methanol 9:1.

Beispiel 5: Synthese des DNA-Fragments einer Länge von 67 Basen von Base Nr. 96 bis Base Nr. 162 des DNA-Stranges (96/67)

a) Abspaltung der 2-Cyanäthylschutzgruppe der Trinukleotide:

10 µMol der Trinukleotide aus Beispiel 3 oder 4 werden unter Feuchtigkeitsausschluss in 60 µl Pyridin-Acetonitril-Triäthylamin 1:1:1 gelöst. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur werden 0,7 ml peroxidfreier Aether zugetropft und der Niederschlag abzentrifugiert.

Das rohe Triethylammoniumsalz wird in 50 µl Pyridin gelöst und nochmals mit 0,5 ml Aether ausgefällt, abzentrifugiert und 15 Stunden am Hochvakuum getrocknet.

b) Kupplung der teilgeschützten Trinukleotide mit der an Polystyrol-Harz gebundenen Oligonukleotidkette:

Alle Operationen werden unter Feuchtigkeitsausschluss in einem Reaktionsgefäß mit 220 µl Inhalt und mikroprozessorgesteuerter Lösungsmittel- und Reagens-Zugabe durchgeführt. 13 mg (0,74 µMol) des Thymidin-Polystyrol-Harzes (Beispiel 1) werden im Reaktionsgefäß vorgelegt und folgenden Operationen unterworfen:

1. Methylenechlorid, 2 ml/min., 4 min.
2. Methylenchlorid-Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2 min.
3. Zinkbromid 1 M und 1,2,4-Triazol 0,02 M in Methylenchlorid-Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 2-3,5 min.
4. Methylenchlorid-Isopropanol (85:15), 2 ml/min., 4 min.
5. Triäthylammoniumacetat 0,5 M in DMF, 2 ml/min., 5 min.
6. Molekularsieb-getrocknetes Pyridin, 2 ml/min., 3 min.
7. Tetrahydrofuran (Peroxid-frei, Molekularsieb-getrocknet), 2 ml/min., 3 min.
8. Stickstoffstrom, 10 min.
9. Injektion 10 µMol Trinukleotid GTC (Trimethylammoniumsalz aus Abschnitt a)) und 8,9 mg (30 µMol) 1-Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) gelöst in 150 µl Pyridin
10. 45°C, 20 min.
11. Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
12. Acetanhydrid 5 % und 4-Dimethylaminopyridin 2,5 % in Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
13. Pyridin, 2 ml/min., 4 min.
14. Pyridin-Isopropanol (1:1), 2 ml/min., 3 min.

Alle 14 Operationen werden 21 mal wiederholt, wobei bei der 9. Operation anstelle von GTC jeweils folgende Trinukleotide in Form ihrer Triäthylammoniumsalze (Abschnitt a)) in der angegebenen Reihenfolge eingesetzt werden: GCA, ACC, GAA, CCC, TAC, AGC, TGA,

CGG, TAC, CGT, GTG, CCA, AAA, AAA, TGA, CGG, TGA, TTC, GGG, CCT, CAT. Die mittlere Kupplungsausbeute beträgt 97 %. Das Endprodukt hat folgende Struktur:

MMT-CATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCAAGTGCCTAACCGTGAAGGTACCCGAAACCCGAG
TCT-Polystyrol

c) Abspaltung des DNA-Fragments vom Träger und Abspaltung der Schutzgruppen:

40,0 mg (ca. 0,60 µMol) DNA-Syntheseharz 96/67 werden mit 66 mg (0,40 mMol) o-Nitrobenzaldoxim und 50 µl (0,40 mMol) 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in 400 µl 95%igem Pyridin während 3 Stunden bei 50°C und während 12 Stunden bei Raumtemperatur gehalten. Nach dem Abblasen des Pyridins mit Stickstoff wird der Rückstand mit 1,6 ml wässrigem Ammoniak (33 %) versetzt und im geschlossenen Gefäß während 24 Stunden bei 50°C gehalten.

Die abgetrennte flüssige Phase wird im Vakuum vom Ammoniak befreit und 3 mal mit je 3 ml peroxidfreiem Diäthyläther gewaschen. Nach dem Abtrennen der niedermolekularen Bestandteile an einer Biogel P6 Säule (100-200 mesh, 3x66 cm, 0,01 Molar Trimethylammoniumhydrogen-carbonat pH 7,5, 1,5 mL/min.) werden 285 ODs (260 nm) DNA isoliert.

Insgesamt 60 ODs werden an einer HPLC-Säule aufgetrennt (PRP-1, Hamilton, 250 x 4,6 mm). Gradient (Lösung A: 0,05 M Triäthylammoniumacetat pH 7,0; Lösung B: Lösung A:Acetonitril 1:1): 30 % B in A → 60 % B in A in 20 min. bei 50°C und 2 mL/min. Der lipophile Hauptpeak (Retentionszeit ca. 14 min.) wird gesammelt, an einer DE52-Cellulose (Whatman) Säule aufkonzentriert, eluiert und mit Aethanol gefällt. Zur Abspaltung der 4-Methoxytrityl-Schutzgruppe wird der Niederschlag in 50 µl Essigsäure/H₂O (4:1) gelöst und 45 min. bei Raumtemperatur gehalten. Das Reaktionsprodukt wird lyophilisiert, mit Aethanol gefällt und zur Reinigung auf einem 8 % Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff) elektrophoretisch aufgetrennt. Die

der erwarteten DNA-Grösse entsprechende Bande wird ausgeschnitten und das Produkt elektroeluiert, an DE52-Cellulose aufkonzentriert und die DNA 96/67 der Struktur

5'-CATCCTGGGTTCTGACCGTGAAAAAAACCAGTGCCTAACCGTGAAGGTACCCGAAACCG
CACTCT-3'

mit Aethanol gefällt.

Beispiel 6: Analog Beispiel 5 werden folgende DNA-Fragmente (5'-3') hergestellt:

1/58
CTGGAATTCACTGGTTGTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCGT

46/64 komplementär
CAGAACCCAGGATCCATTGTTACCCCTGACCGCAAACGTTAGAACCTTCCACAGGCACAGGTT

154/64 komplementär
CAGGATCCTACTGCAGGTATTCTCCGGGATTCTCGAAGTCACCGTCCGTGAGACTGCGG

Beispiel 7: Phosphorylierung der Fragmente 1/58, 46/64 komplementär, 96/67 und 154/64 komplementär

Die Phosphorylierung und die radioaktive Markierung an den 5'-Enden erfolgt mit (γ -³²P)ATP und T₄ Polynukleotid-Kinase (Boehringer) wie beschrieben (18).

Beispiel 8: Polymerisation zu Duplex II (Teilstück F₂ des Desulfatohirudin-Gens)

Je 50 pMol Fragment 96/67 kinasiert und Fragment 154/64 kinasiert werden in 24 µl Wasser gelöst, die Lösung während 3 min. auf 90°C erwärmt und innerhalb von 5 min. auf 12°C abgekühlt. Nach Zugabe von 4 µl Endo-R Puffer (0,1 Molar Tris-HCl pH 7,5, 66 mM MgCl₂, 66 mM 8-Mercaptoäthanol, 0,6 M NaCl), 10 µl Deoxynucleosidtriphosphat-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, TTP, je $2 \cdot 10^{-3}$ Molar, mit NH₃ auf pH 7,0 eingestellt) und 2 µl (10 Einheiten) DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer) wird während 30 min. bei 12°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 3 minütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt und das Gemisch bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

In analoger Weise werden die Fragmente 1/58 kinasiert und 46/64 kinasiert zum Duplex I (Teilstück F₁ des Desulfatohirudin-Gens) umgesetzt.

Die Duplexe I und II haben die folgenden Strukturen:

Duplex I

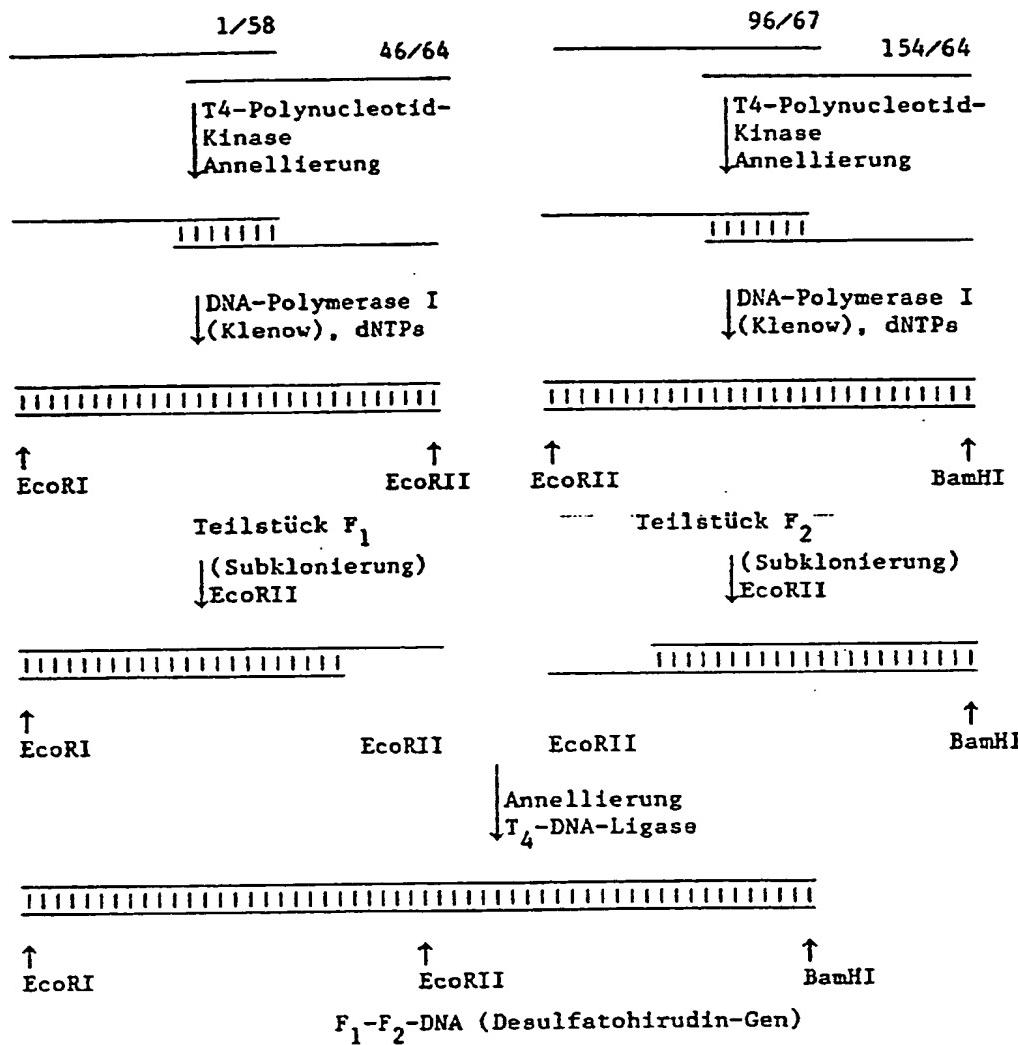
CTGGAATTCATGGTGTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGTTC
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCAAG
TAACGTTTGCCTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGTTCTG
ATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTACGTAGGACCCAAGAC

Duplex II

CATCCTGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCACTGCGTTACCGGTGAAGGTACCCGAAACCGCAGTC
GTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTGGTCACGCAATGGCCACTTCCATGGGCTTGGCGTCAGAG
ACAACGACGGTGAATTGAAAGAAATCCCGAAGAATACTGCAGTAGGATCCTG
TGTGCTGCCACTGAAGCTTCTTAGGGCTTATGGACGTACCTAGGAC

Die Herstellung der Teilstücke F₁ und F₂ des Desulfatohirudin-Gens ist im folgenden Schema I dargestellt:

Schema 5: Herstellung der Teilstücke F_1 und F_2 des Desulfato-hirudin-Gens und der F_1 - F_2 -DNA



Beispiel 9: Polymerisation und Ligation der Fragmente 1/58.

46/64 kinasiert, 96/67 kinasiert und 154/64;

Herstellung des Desulfatohirudin-Gens

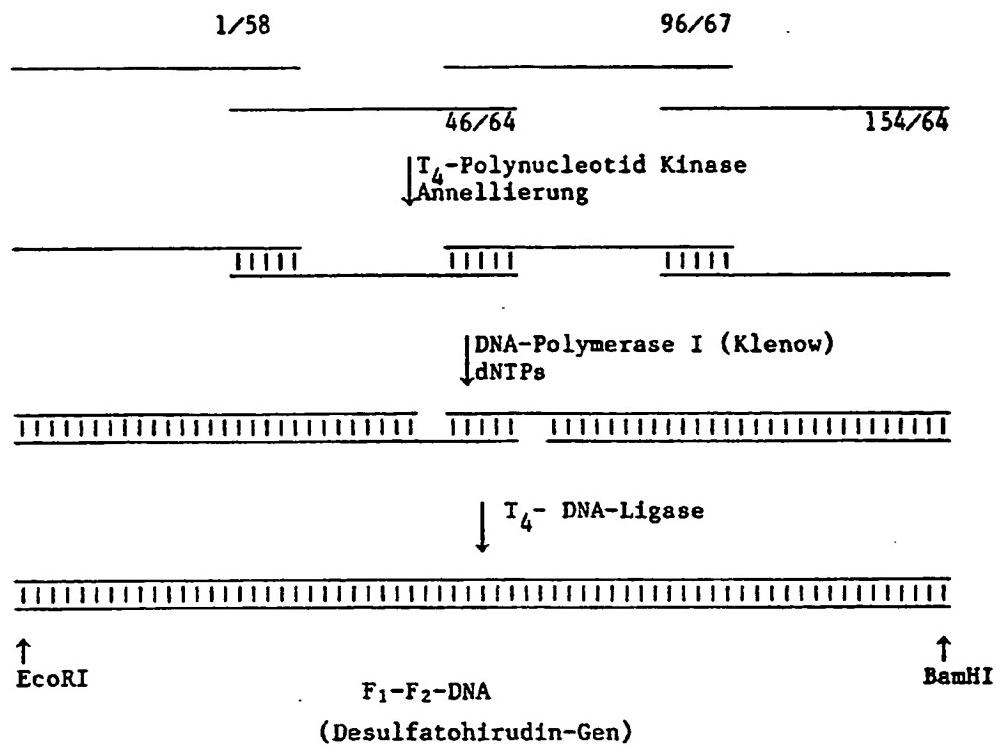
Je 50 pMol Fragment 1/58, 46/64 kinasiert, 96/67 kinasiert und 154/64 werden in 48 µl Wasser gelöst, die Lösung während 3 min. auf 90°C erwärmt und innerhalb 5 min. auf 12°C abgekühlt. Nach Zugabe von 8 µl Endo-R Puffer (vgl. Beispiel 8), 20 µl Deoxynucleosidtriphosphat-Gemisch (dATP, dCTP, dGTP, TTP, je 0,002 Molar, mit NH₃ auf pH 7.0 eingestellt) und 2 µl (10 Einheiten) DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer) wird während 30 min. bei 12°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 3-minütiges Erhitzen auf 90°C gestoppt und die DNA nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Aethanolfällung isoliert. Das entstandene DNA-Gemisch wird in 100 µl Ligase-Puffer (66 mM Tris-HCl pH 7.5, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 5 mM ATP) gelöst, mit 50 Einheiten (2 µl) T4 DNA-Ligase (Biolabs) versetzt und während 20 Stunden bei 20°C inkubiert. Die Reaktion wird durch 5-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die DNA nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Aethanolfällung isoliert. Nach Auftrennung des Gemisches an einem 8 % Polyacrylamidgel (denaturierend) durch Elektrophorese wird das Ligationsprodukt mit 217 Basenpaaren elektroeluiert, an einer DE52-Cellulose-Säule aufkonzentriert und nach Elution durch Ethanolfällung isoliert.

Das Desulfatohirudin-Gen hat die folgende Struktur:

CTGGAATTCA~~TGTTGTTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCC~~TGCGAAGGT
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTGGACACGGACACGCTTCCA
TCTAACGTTTGC~~GGTCAGGGTAACAAATGCATCCTGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCA~~CCAGTGCCTT
AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTTACGTAGGACCCAAAGACTGCCACTTTTTGGTCACGCAA
ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAAACGACGGTGACTTCAAGAAATCCCGGAAGAA
TGGCCACTCCATGGGC~~TGGCTCAGAGTGTGCTGCCACTGAAGCTTCTT~~AGGGCCTTCTT
TACCTGCAGTAGGATCCTG
ATGGACGT~~CATCCTAGGAC~~

Die Herstellung des Desulfatohirudin-Gens aus den vier Fragmenten ist im folgenden Schema II dargestellt:

Schema 6: Herstellung des Hirudin-Gens aus den vier synthetischen Fragmenten



Beispiel 10: Herstellung des Plasmids pML 300, enthaltend die F₁-DNA des Desulfatohirudin-Gens (Fig. 1)

a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/PvuII.

5 µg pBR322 Plasmid-DNA werden mit 5 Einheiten PvuII Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 200 ml einer Lösung aus 100 µg/ml Gelatine für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Anschliessend wird diese Lösung auf 100 mM Tris·HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl eingestellt und die DNA mit

30 Einheiten EcoRI-Restriktionsendonuclease (Biolabs) für 2 Stunden bei 37°C verdaut. Dann wird die Lösung auf 50 mM Tris-HCl pH 8 eingestellt und bei einer DNA-Konzentration von 10 µg/µl mit 2 Einheiten intestinaler alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen der Lösung während 60 min. bei 65°C inaktiviert. Dann wird die Lösung auf TNE eingestellt, mit 1 Volumen Phenol und Chloroform extrahiert und die verdaute DNA mit 2 Volumen Alkohol bei -20°C über Nacht ausgefällt.

Der aus der pBR322 DNA herausgeschnittene Vektor (pBR322/EcoRI/-PvuII, 2297 Basenpaare) wird durch Gelelektrophorese an 1%iger niedrig schmelzender Agarose(Biorad) in Tris-Acetat-EDTA Puffer pH 8 vom kleinen DNA-Fragment (2067 Basenpaare) abgetrennt. Nach Anfärben der DNA im Agarosegel mit EtBr wird die Stelle des Gels, welche die DNA-Bande des pBR322/EcoRI/PvuII Vektors (= 2297 Basenpaare) enthält, aus dem Gel ausgeschnitten und bei 65°C 10 min. verflüssigt. Zu dieser DNA-Lösung werden 20 Volumina TNE hinzugefügt, die DNA nach Mueller et al. (19) durch DE-52 Chromatographie gereinigt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA bei -20°C über Nacht mit Alkohol ausgefüllt. Der DNA-Niederschlag wird in 50 µl 0,01 M Tris-HCl (pH 8), 0,1 mM EDTA gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. 1,4 µg (= 3,2 pMol Enden) DNA werden erhalten.

b) Herstellung der F_1 -DNA/EcoRI

24 ng (= 1,3 pMol Enden) der chemisch synthetisierten F_1 -DNA (siehe Beispiel 8) werden mit 5 Einheiten EcoRI Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 50 µl 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl und 100 µg/ml Gelatine für 30 min. bei 37°C verdaut. Danach werden der Lösung 0,06 µg (= 0,14 pMol Enden) des linearisierten Vektors pBR322/EcoRI/PvuII (Beispiel 10a) zugesetzt. Anschliessend wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C nach 10 min inaktiviert, die Lösung

auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wird mit Alkohol präzipitiert. Die ausgefällte DNA wird unter Alkohol bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

c) Ligierung der pBR322/EcoRI/PvuII Vektor-DNA mit der F_1 -DNA/EcoRI und Konstruktion des Plasmids pML300.

Der in Beispiel 10b) erhaltene DNA-Niederschlag, welcher die beiden genannten DNA-Bruchstücke enthält, wird in 20 µl einer Lösung von 50 mM Tris·HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 25 Einheiten/µl T₄ DNA-Ligase (Biolabs) bei 15°C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML300, welches die F_1 -DNA enthält.

d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML300

Die für die Transformation notwendigen mit Calcium vorbehandelten E. coli HB101 Zellen werden, wie von Mandel et. al. (14) beschrieben, hergestellt.

Die unter c) erhaltene Lösung, welche das rekombinierte Plasmid pML300 enthält, wird für 10 min. auf 65°C erhitzt, um die T₄-DNA Ligase zu inaktivieren und anschliessend auf 37°C abgekühlt. 10 µl dieses Reaktionsgemisches werden zu 150 µl Calcium-behandelten E. coli HB101-Zellen in 10 mM MgCl₂ und 10 mM Tris·HCl (pH 7.5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl gegeben.

Danach wird diese Mischung für 30 min. in Eis gekühlt, 2 min. auf 42°C erwärmt und dann 50 min. in 1 ml L-Medium (vgl. Beispiel 18) bei 37°C stehen lassen. Darauf wird die Mischung in Aliquoten à 0.2 ml auf 5 Agarplatten (McConkey-Agar, Difco), welche 60 µg/ml Ampicillin (Serva) enthalten, ausgestrichen. Die Agarplatten werden hernach bei 37°C für 16-18 Stunden gehalten. 484 Ampicillin-resistente Kolonien des transformierten E. coli HB 101 werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F_1 -DNA enthalten

470 transformierte Kolonien (Beispiel 10d) werden auf Nitrozellulosefilter B85 (Schleicher und Schüll) abgedrückt. Nach Grunstein und Hogness (20) werden die Kolonien lysiert und ihre denaturierte DNA auf dem Filter fixiert. Anschliessend erfolgt eine Vorhybridisierung der Filter in 20 ml (pro Filter) 4xSET [= Lösung von 30 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA], 0.1 % (g/v) Ficoll 400 (Pharmacia), 0.5 % SDS, 50 µg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA für 4 Stunden bei 64°C. Danach werden die Nitrozellulosefilter in 20 ml (pro Filter) 5xSET (g/v) Ficoll 400, 0.2 % SDS und 50 µg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA für 16 Stunden bei 64°C mit der 32 P-radioaktiv markierten Probe (ca. 10^3 - 10^4 Cerencov cpm pro Filter) behandelt. Als Probe wird das Oligonucleotid 46/64 komplementär (vgl. Beispiel 6) verwendet.

Anschliessend werden die Filter in 2xSET, 0.2 % SDS bei Raumtemperatur zweimal gewaschen, danach zweimal in 2xSET, 0.5% SDS bei 60°C (zuerst 30 min., dann 60 min. lang). Dann werden die Filter zwischen 3 MM Papier (Whatman) getrocknet und bei -80°C auf einen Röntgenfilm (Fuji) mit einer Verstärkerfolie (Intensifying screen, Ilford) für 1-2 Tage gelegt.

Das erhaltene Autoradiogramm zeigt 71 positive Kolonien (Klone), die zur Weiterarbeit verwendet werden können, eine davon erhielt die Bezeichnung pML300.

Beispiel 11: Herstellung des Plasmids pML305, welches die F_2 -DNA des Desulfatohirudin-Gens enthält (Fig. 2).

a) Herstellung des linearisierten Vektors pBR322/BamHI/NruI

5 µg pBR322 Plasmid-DNA werden mit 30 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease 30 min. bei 37°C in einer Lösung von 100 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine verdaut. Anschliessend werden der Lösung 15 Einheiten PvuII Restriktionsendonuclease zugefügt und 2 Stunden bei 37°C verdaut.

Das Reaktionsgemisch wird für 10 min. auf 70°C erwärmt, um die Enzyme zu inaktivieren. Danach werden die beiden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese an 1%iger niedrigschmelzender Agarose in Tris-Acetat EDTA Puffer pH 8 voneinander getrennt. (siehe Beispiel 10a).

Die DNA-Bande des pBR322 BamHI/PvuII Vektors (= 2672 Basenpaare) wird ausgeschnitten, verflüssigt und nach Mueller et al. (19) durch DE-52 Chromatographie gereinigt. 0,75 µg (= 1,5 pMol Enden) DNA werden erhalten.

b) Herstellung der F_2 -DNA/BamHI

25 µg (= 1,3 pMol Enden) der chemisch synthetisierten F_2 -DNA (Beispiel 8) werden mit 16 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 20 µl 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂ und 100 µg/ml Gelatine für 30 min. bei 37°C verdaut. Anschliessend werden der Lösung 60 ng (= 96 nMol Enden) des linearisierten Vektors pBR322/BamHI/PvuII (Beispiel 11a) zugesetzt, die ganze Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumen Alkohol ausgefällt. Die ausgefällte DNA wird bis zur Weiterverarbeitung unter Alkohol bei -20°C gelagert.

c) Ligierung der pBR322/BamHI/PvuII Vektor-DNA mit der F_2 -DNA/BamHI und Konstruktion des Plasmids pML305

Der unter Beispiel 11b) erhaltene DNA-Niederschlag, der die beiden genannten DNA-Bruchstücke enthält, wird in 20 µl einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 15 Einheiten/µl T₄ DNA-Ligase (Biolabs) bei 15°C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML305, welches die F_2 -DNA enthält.

d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML305

Die Transformation der mit Calcium behandelten E. coli HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 10d) beschrieben. Es werden 10 µl des in Beispiel 12c) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 313 Ampicillin-resistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F₂-DNA enthalten

65 transformierte Kolonien (Beispiel 11d) werden auf F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 10e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird das Oligonucleotid 154/64 komplementär (vgl. Beispiel 6) verwendet. Im Autoradiogramm werden 2 positive Kolonien erhalten, eine davon erhält die Bezeichnung pML305.

Beispiel 12: Charakterisierung der Klone pML300 und pML305

Die DNAs der rekombinierten Plasmide pML300 und pML305 werden nach Ish-Horowitz isoliert (21). Die Nucleotidsequenzen des F₁-DNA- und F₂-DNA-Inserts werden nach Maxam und Gilbert bestimmt (11). Zu diesem Zweck werden je 10 µg Plasmid-DNA von pML300 mit EcoRI-Restriktionsendonuclease und 10 µg Plasmid-DNA von pML305 mit BamHI-Restriktionsendonuclease gespalten und die linearisierten DNAs durch Geleleution aus Agarosegel isoliert [vgl. Beispiel 10a)]. Anschliessend werden die isolierten DNAs mit alkalischer Phosphatase verdaut und über DE-52 chromatographiert (vgl. Beispiel 11a). Danach werden die DNAs am 5'-Ende mit [γ -³²P]ATP (spezifische Aktivität > 5000 Ci/mmol, Amersham) und T₄-Polynucleotid-Kinase (P-L-Biochemicals) radioaktiv markiert.

Die radioaktiv markierten DNAs werden dann mit einer zweiten Restriktionsendonuclease (EcoRII) gespalten. Die entstandenen DNA-Fragmente werden durch Geleleution aus Agarose isoliert. Im Falle von pML300 wird dann vom EcoRII-EcoRI* Fragment (ca. 109 Basenpaare) die Nucleotidsequenz der F₁-DNA, im Fall vom pML300 die der F₂-DNA im EcoRII-BamHI*-Fragment (ca. 122 Basenpaare) bestimmt. (* gibt das DNA-Ende an, das radioaktiv markiert ist).

Die Nucleotidsequenzen, welche für die F_1 -DNA, und F_2 -DNA bestimmt werden, sind identisch mit den im Beispiel 8 dargestellten.

Beispiel 13: Herstellung des Expressionsplasmids pML310

- a) Konstruktion des linearisierten Vektors pHK148/EcoRI/BamHI,
welcher den trp-Promotor-Operator enthält (Fig. 3 und Fig. 4)

A. Konstruktion des Plasmids p159

10 µg Plasmid pBRH_{trp} (22) werden mit 50 Einheiten EcoRI (Biolabs) gespalten während 60 min. bei 37°C, und das Verdauungsgemisch wird nach Phenolextraktion durch einen Saccharose-Dichtegradienten (5-23 %) in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA in einem TST41 (Kontron AG) Rotor fraktioniert. Die Zentrifugation dauert 14 Stunden bei 40 000 upm und 15°C. 0,3 ml Fraktionen werden mit einem ISCO-Gradientkollektor bei 1 ml/min. gesammelt. Die Fraktionen, welche das kleinere Fragment enthalten, werden vereinigt, die Lösung wird auf TNE eingestellt und mit 2 Volumen Aethanol bei -20°C gefällt. Die DNA wird nach Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA gelöst. 5 µg dieses DNA-Fragmentes werden mit 5 Einheiten BglII (Biolabs) 60 min. bei 37°C gespalten. Das Reaktionsgemisch wird mit Phenol und Chloroform extrahiert und die DNA wird mit 2 Volumen Aethanol bei -80°C während 10 min. inkubiert und die DNA durch Zentrifugation gesammelt und erneut in 50 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. 2 µl von dieser Lösung werden entnommen (0,2 µg DNA) und bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) mit 1 Einheit intestinaler alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen der Lösung während 60 min. bei 65°C inaktiviert. 0,04 µg DNA wird entnommen und 5'-terminal mit 10 µCi [γ -³²P]-ATP (>5000 Ci/mmol, Amersham) und 5 Einheiten T₄ Polynukleotid-Kinase (P-L Biochemicals) in 20 µl Reaktionsvolumen in 50 mM Tris-HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl₂, und 5 mM DTT, während 30 min. bei 37°C inkubiert. Die radioaktive Probe wird mit der nicht-markierten Probe (siehe oben) gemischt und die DNA-Fragmente werden durch einen 5-23 % Saccharose-Dichte-

gradienten in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA in einem TST60 Rotor fraktioniert. Die Zentrifugation erfolgt während 5 Stunden bei 60 000 upm und 15°C. Es werden 0,2 ml Fraktionen gesammelt. Die Radioaktivität jeder Fraktion wird durch Messung der Cerencov-Strahlung bestimmt und die Fragmente damit identifiziert. Die gewünschten Fraktionen, welche das kleine DNA-Fragment enthalten, werden vereinigt, die DNA mit 2 Volumina Aethanol gefällt und nach Zentrifugation wieder in 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA gelöst.

Das ³²P-markierte EcoRI-BglII DNA-Fragment wird mit 0,2 Einheiten TaqI (Biolabs) in 50 µl Volumen während 10 min. bei 37°C partiell gespalten. Das Reaktionsgemisch wird auf 0,2 % SDS, 10 % Glycerin, 10 mM EDTA, 0,05 % Bromphenol-Blau eingestellt und die DNA-Fragmente auf einem 6 % Polyacrylamidgel in Tris-Borat-EDTA (23) aufgetrennt. Auf dem Autoradiogramm wird die das gewünschte EcoRI-TaqI enthaltende Bande (das grösste Teilfragment) identifiziert. Dieses Fragment (L, siehe Fig. 3) wird aus dem Gel extrahiert und gereinigt (19) und in 10 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA gelöst.

Als Akzeptor-Plasmid wird pBR322, welches mit Clal und EcoRI gespalten ist, verwendet: 2 µg pBR322 werden mit 4 Einheiten Clal (Biolabs) in 20 µl Reaktionsvolumen während 60 min. bei 37°C verdaut. Das Protein wird mit Phenol extrahiert und die DNA anschliessend mit 2 Volumina Aethanol bei -80°C während 10 min. gefällt. Die DNA wird durch Zentrifugation gesammelt und dann mit 10 Einheiten EcoRI (Biolabs) während 30 min. bei 37°C in 20 µl Reaktionsvolumen verdaut. Anschliessend wird die Lösung mit 2 Volumina 0,1 M Tris-HCl (pH 8,7) versetzt und mit 1 Einheit alkalischer Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wird anschliessend durch Inkubation bei 65°C während 60 min. inaktiviert.

100 ng des Akzeptor-Plasmids werden mit 5 µl Fragment L-DNA in 15 µl Reaktionsvolumen in 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM DTT, 0,5 mM ATP mit 30 Einheiten pro µl Reaktionsvolumen T₄ DNA-Ligase (Biolabs) während 2 Stunden inkubiert.

5 µl dieser Lösung werden zu einem Gemisch gegeben, das 150 ml mit Calciumchlorid behandelte E. coli HB101-Zellen (14) in 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) in einem Gesamtvolumen von 200 µl enthält. Das Gemisch wird 20 min. in Eis gekühlt, 1 min. auf 42°C erhitzt und 10 min. bei 20°C inkubiert. 1 ml Trypton-Medium [Trypton-Medium enthält 10 g Bacto-Trypton (Difco); 1 g Hefeextrakt (Difco); 1 g Glucose; 8 g NaCl und 294 mg CaCl₂·2H₂O in 1 l destilliertem Wasser] wird zugesetzt und das Gemisch 30 min. bei 37°C unter Schütteln bei 300 U/min. inkubiert. Die Mischung wird auf zwei Agarplatten (McConkey Agar, Difco; 0,6 ml/Platte), supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin (Sigma), plattierte. Die Platten werden 12 bis 17 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die Plasmid-DNA von 10 verschiedenen Kolonien wird wie folgt isoliert:

Die Kolonien werden zur Inokulierung von 10 ml Trypton-Medium, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, wie oben, in einem 25 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kulturen werden 15 bis 18 Stunden bei 37°C und 300 U/min. geschüttelt. Die Zellen werden durch Zentrifugieren (Sorval, HS-4 Rotor, 10 min. bei 4000 U/min., 4°C) erntet. Man erhält etwa 0,1 g Zellen, und diese werden in 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. 0,25 ml Lysozymlösung [10 mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); Lysozym wird von Sigma vertrieben] werden zugesetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei 0°C werden 0,15 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) zugegeben. Nach weiteren 10 min. bei 0°C werden 60 µl 2%iges Triton X-100 (Merck) zugegeben. Nach 30 min. bei 0°C wird die Probe 30 min. bei 15'000 U/min. und 4°C in einem Sorval SA-600 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird mit 1 Vol. Phenol (gesättigt in TNE) deproteinisiert. Die Phasen werden durch Zentrifugieren (Sorval HB-4 Rotor) während 10 min. bei 5000 U/min. und 4°C getrennt. Die obere Phase wird zweimal mit 1 Vol. Chloroform

extrahiert. Pankreatische RNase A (Sigma; 10 mg/ml in TNE 10 min. bei 85°C vorerhitzt) wird bis zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben und das Gemisch 40 min. bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird dann auf 1M NaCl und 10 % Polyethylenglykol 6000 (Fluka, 20 min. bei 120°C im Autoklaven behandelt) eingestellt und 2 Stunden bei -10°C inkubiert. Das Präzipitat wird in einem Sorval HB-4 Rotor (20 min. bei 10 000 U/min., 0°C) gesammelt und erneut in 100 µl TNE gelöst. Die DNA-Lösung wird mit 1 Vol. Phenol extrahiert und die DNA wird mit 2 Vol. Aethanol 10 min. bei -80°C präzipitiert. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren in einer Eppendorf-Zentrifuge gesammelt und die DNA erneut in 20 µl 10 mM Tris·HCl (pH 7,5) und 0,5 mM EDTA gelöst. Aus einer 10 ml Kultur gewinnt man 8 bis 10 µg Plasmid-DNA.

Die Plasmid-DNAs werden nach Verdauung mit den folgenden Restriktionsenzymen analysiert:

Je 0,5 µg Plasmid-DNA wird mit HpaI (Biolabs) sowie mit HpaI (Biolabs) und EcoRI (Biolabs) mit Clal (Biolabs) nach Standard-Vorschriften, gemäss Angaben des Enzym-Herstellers, gespalten. Die DNAs werden auf einem 1 % Agarose-Gel in 40 mM Tris·Acetat (pH 7,8) 1 mM EDTA und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Die gewünschten Plasmide enthalten eine HpaI-Stelle und ergeben nach der 3-fachen Verdauung neben dem grossen DNA-Fragment 2 kleinere Fragmente, welche grösser sind als das kleine EcoRI-Clal-Fragment von pBR322. Eines dieser Plasmide wird mit p159 bezeichnet (siehe Fig. 3).

B. Konstruktion des Plasmids pHRI145

2 µg p159-DNA werden mit 10 Einheiten EcoRI (Biolabs) während 30 min. bei 37°C verdaut. Die DNA wird mit Phenol extrahiert, mit Aethanol gefällt und nach Zentrifugation in 10 µl 10 mM Tris·HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst. Die mit EcoRI verdaute DNA wird weiterhin mit 5 Einheiten DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) (Boehringer) in 10 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, 50 mM NaCl, 0,1 mM dATP (P&L Biochemicals), 0,1 mM dTTP (P&L Biochemicals) während 15 min. bei 12°C behandelt. Die Polymerase wird anschliessend durch Inkubation bei 85°C während 5 min. inaktiviert. Das Reaktionsgemisch wird in

20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP (Sigma) auf das 10fache verdünnt und mit 30 Einheiten T₄ DNA-Ligase pro µl Reaktionsgemisch während 1 Stunde bei 15°C inkubiert.

50 ng der DNA werden in E. coli transformiert (wie oben beschrieben) und auf McConkey-Agarplatten supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert.

Die Plasmid-DNAs von 10 verschiedenen Kolonien wird, wie oben beschrieben, isoliert. Die Plasmid-DNAs werden analysiert durch Verdauung mit EcoRI. Die gewünschten Plasmide sind EcoRI-resistant. Die Analyse erfolgt wie oben beschrieben. Eines der gewünschten Plasmide wird als pHR1145 bezeichnet (Fig. 3).

C. Konstruktion des Plasmids pHR1145

2 µg pHR1145-DNA werden mit 5 Einheiten Clal (Boehringer) während 60 min. bei 37°C behandelt, dann mittels Phenol-Extraktion deproteinisiert. Die DNA wird mit Aethanol gefällt und dann in 20 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst. Die überhängenden Enden werden, wie oben beschrieben, mit DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt, mit der Änderung, dass dATP und dTTP ersetzt werden durch dCTP (P&L Biochemicals) und dGTP (P&L Biochemicals). Die Polymerase wird inaktiviert durch Inkubation bei 85°C während 5 min. Das Reaktionsgemisch wird mit 2 Volumina 0,1 M Tris-HCl (pH 8,7) versetzt und mit 0,5 Einheiten Kälber-Phosphatase (Boehringer) während 30 min. bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird deproteinisiert durch Phenol-Extraktion. Die DNA wird mit Aethanol gefällt und in 8 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA gelöst.

Ein chemisch synthetisierter DNA-Linker der Formel



wird am 5'-Ende phosphoryliert, indem 8 pMol des Linkers mit 5 µCi [γ -³²P]-ATP (5500 Ci·mmol⁻¹ Amersham) in 8 µl Reaktionsvolumen, welches 0,1 mM rATP (Sigma), 50 mM Tris-HCl (pH 9,5), 10 mM

MgCl₂, 5 mM DTT und 2 Einheiten T₄ Polynucleotid-Kinase (P&L Biochemicals) enthält, während 30 min. bei 37°C inkubiert werden. Die Reaktion wird gestoppt durch Einfrieren bei -80°C.

Der radioaktiv markierte Linker wird anschliessend mit 1 µg ClaI und Phosphatase behandelt und mit pHR1145-DNA (siehe oben) in einem 20 µl Reaktionsvolumen ligiert, welches 0,5 mM rATP (Sigma), 10 mM DTT (Calbiochem), 20 mM Tris·HCl (pH 7,8), 1 mM MgCl₂ und 800 Einheiten T₄ DNA-Ligase (Biolabs) enthält. Die Inkubation erfolgt bei 15°C während 2 Stunden. Die Ligase wird inaktiviert durch Inkubation bei 85°C während 10 min. Anschliessend werden 2 Volumina Wasser hinzugegeben, die Kochsalz-Konzentration auf 10 mM eingestellt und 20 Einheiten KpnI (Biolabs) hinzugegeben während 30 min. bei 37°C. Nach der Extraktion mit Phenol und Chloroform wird die Mischung durch ein 0,9 % niedrigschmelzendes Agarose-Gel (Biorad) in 40 mM Tris·Acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Die durch UV-Bestrahlung sichtbare Bande, welche die gleiche Mobilität wie eine Marker-DNA gleicher Grösse aufzeigt, wird mit einem Skalpell herausgeschnitten. Das Gelstück wird 5 min. bei 65°C geschmolzen und dann auf 37°C abgekühlt. Man erhält ein Volumen von ca. 20 µl. 5 µl dieser Lösung werden entnommen und mit 400 Einheiten T₄-Ligase (Biolabs) in 10 µl Reaktionsvolumen, welches auf 0,5 mM ATP, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris·HCl (pH 7,8) eingestellt wird, während 12 Stunden bei 15°C inkubiert. 1/10 Volumen einer Lösung mit 100 mM Tris·HCl (pH 7,5), 100 mM CaCl₂ und 100 mM MgCl₂ werden zum Ligase-Gemisch (solifidiziert bei 15°C) hinzugeben und bei 65°C während 5 min. inkubiert. Die Lösung wird dann verwendet, um mit Calcium behandelte E. coli HB101-Zellen, wie oben beschrieben, zu transformieren. Es wird auf McConkey-Agarplatten, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin, ausplattiert.

Die Plasmid-DNAs von 10 verschiedenen Kolonien werden isoliert, wie oben beschrieben, und die DNA wird der folgenden Restriktionsenzymanalyse unterworfen: Je 0,5 µg Plasmid DNA wird nacheinander mit KpnI (Biolabs), NcoI (Biolabs) und EcoRI (Biolabs) nach den Vorschriften des Enzym-Herstellers gespalten. Die Spaltprodukte werden

auf 1 % Agarose-Gelen in 40 mM Tris-Acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid fraktioniert. Alle Plasmide zeigen je eine dieser Enzymspaltstellen, wie gewünscht. Eines wird als HR1148 bezeichnet.

Das Plasmid HR1148 enthält einen Tryptophan-Promotor-Operator und eine ribosomale Bindungsstelle bis und mit ATG. Hirudin als auch andere heterologe Gene können direkt über die einmalig im Plasmid vorhandenen EcoRI, NcoI, KpnI-Stellen angekoppelt werden. Des Weiteren ermöglicht diese Konstruktion das direkte Koppeln und Expressieren von heterologen Genen, ohne dass das für die Initiation der Translation notwendige ATG auf dem entsprechenden Gen vorhanden sein muss. Dies kann leicht erreicht werden durch Spaltung mit NcoI und Auffüllen der überhängenden Enden mit DNA-Polymerase I, wie beschrieben, oder durch Spalten mit KpnI und Entfernen der überhängenden Enden durch Nuklease S₁. Das Plasmid HR1148 ist somit ein breit anwendbares Expressionsplasmid.

D. Herstellung des linearisierten Vektors pHR1148/EcoRI/BamHI

5 µg Plasmid-DNA von pHR1148 werden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI, verdaut. Der herausgeschnittene Vektor pHR1148/EcoRI/BamHI wird mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

b) Herstellung der F₁-DNA/EcoRI/EcoRII und der F₂-DNA/BamHI/EcoRII

I. Herstellung der F₁-DNA/EcoRI/EcoRII

5 µg Plasmid DNA vom pML 300 werden zuerst mit 10 Einheiten EcoRI Restriktionsendonuklease in 50 µl einer Lösung von 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 µg/ml Gelatine für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Ein Aliquot (0,5 µg) dieser linearisierten Plasmid DNA/EcoRI wird durch Gelektrophorese aus einem Agarosegel isoliert (vgl. Beispiel 10a)) und mit [γ -³²P]ATP radioaktiv markiert (vgl. Beispiel 12). Die Hauptmenge der Plasmid DNA/EcoRI wird dann mit dieser

radioaktiv markierten DNA vermischt, mit EcoRII Restriktionsendonuclease verdaut und das EcoRII-EcoRI* DNA Fragment (109 Basenpaare) durch Gelelektrophorese an 8 % Polyacrylamid getrennt. 200 µg der F₁-DNA/EcoRI*/EcoRII werden durch Gelelution isoliert.

II) Herstellung der F₂-DNA/BamHI/EcoRII

5 µg Plasmid DNA vom pML 305 werden mit 10 Einheiten BamHI Restriktionsendonuclease gespalten. Ein Aliquot (0,5 µg) dieser linearisierte Plasmid DNA/BamHI wird durch Gelelution aus einem Agarosegel isoliert (vgl. Beispiel 10a)) und mit [γ -³²P] radioaktiv markiert.. (vgl. Beispiel 12)). Die Hauptmenge der Plasmid DNA/BamHI wird dann mit dieser radioaktiv markierten DNA vermischt, mit EcoRII Restriktionsendonuclease verdaut und das EcoRII-BamHI* DNA Fragment (122 Basenpaare) durch Gelelektrophorese an 8 % Polyacrylamid getrennt. 250 µg der F₂-DNA/BamHI*/EcoRII werden isoliert.

c) Ligation der F₁-DNA mit der F₂-DNA und Konstruktion des Expressions-Plasmids pML310

10 ng (= 473 nMol Enden) F₁-DNA/EcoRI/EcoRII und 9 ng (= 495 nMol Enden) F₂-DNA/BamHI/EcoRII werden in einem Volumen von 20 µl mit T₄-DNA Ligase, wie bereits unter Beispiel 10c) beschrieben, behandelt. Anschliessend wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird dann wie in Beispiel 10c) beschrieben gelöst und mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease verdaut. Die Lösung wird dann auf TNE eingestellt und 30 ng (= 50 nMol Enden) der Vektor-DNA pHRL48/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 13aD) zugegeben. Anschliessend wird die Lösung abermals mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Die präzipitierte DNA-Mischung wird, wie in Beispiel 10c) angegeben, mit T₄-DNA Ligase (Biolabs) behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung ein rekombiniertes Plasmid, welches die F₁-F₂-DNA (Desulfatohirudin-Gen) als Insert enthält.

d) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasid pML 310

Die Transformation der mit Calcium behandelten E. coli HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 10d) beschrieben. Es werden 10 μ l des in Beispiel 13c) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 420 Ampicillin resistente Kolonien werden erhalten.

e) Screening der Kolonien, die F_1 - F_2 -DNA enthalten

18 transformierte Kolonien (Beispiel 13d) werden auf ihren F_1 - F_2 -DNA-Gehalt geprüft, wie in Beispiel 10e) beschrieben. Als radioaktive Probe wird eine Mischung der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Oligodeoxynucleotide verwendet. Im Autoradiogramm werden 12 positive Kolonien erhalten, fünf davon erhalten die Bezeichnung pML310, pML311, pML312, pML313, pML314.

Beispiel 14: Charakterisierung des Klons pML310

Die Charakterisierung der F_1 - F_2 -DNA-Sequenz in dem rekombinierten Plasmid pML310 erfolgt durch Sequenzierung der F_1 - F_2 -DNA nach Maxam und Gilbert (11), wie in Beispiel 12 beschrieben. 10 μ g Plasmid-DNA werden geprüft. Die Nucleotidsequenz der F_1 - F_2 -DNA ist mit der für das synthetische Desulfatohirudin-Gen beschriebenen identisch.

Beispiel 15: Herstellung des Expressionsplasmids pML 315

a. Ligation der F_1 -DNA mit der F_2 -DNA und Konstruktion des Expressionsplasmids pML315

24 μ g (= 1,3 pMol Enden) bzw. 26 μ g (= 1,3 pMol Enden) des chemisch synthetisierten F_1 - bzw. F_2 -DNA (siehe Beispiel 8 und Schema I) werden in einem Volumen von 20 μ l mit 5 Einheiten EcoRII Restriktionsendonuclease (Biolabs) in 50 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 μ g/ml Gelatine für 30 min. bei 37°C verdaut. Anschliessend wird die Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol präzipitiert. Der DNA-Niederschlag wird dann wie in Beispiel 10c) beschrieben gelöst und mit T₄-DNA-Ligase drei Stunden bei 15°C behandelt. Danach wird die

Mischung mit Phenol/Chloroform extrahiert und wie in Beispiel 10b) beschrieben gefällt. Der DNA-Niederschlag wird anschliessend gelöst (vgl. Beispiel 10c) und mit EcoRI- und BamHI-Restriktionsendonuclease für 30 min. bei 37°C verdaut. Danach werden der Lösung 70 ng (= 0.1 pMol Enden) des linearisierten Vektors pHRL148/EcoRI/BamHI (Beispiel 13aD) zugesetzt, die ganze Lösung auf TNE eingestellt und mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit 2 Volumen Alkohol ausgefällt.

Der erhaltene DNA Niederschlag, der die beiden DNA Bruchstücke (F_1 - F_2 -DNA/EcoRI/BamHI und pHRL148/EcoRI/BamHI) enthält, wird in 20 µl einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 100 µg/ml Gelatine gelöst und mit 15 Einheiten/µl T₄-DNA Ligase (Biolabs) bei 15°C für 3 Stunden behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung das rekombinierte Plasmid pML315, welches die F_1 - F_2 -DNA (= Desulfatohirudin-Gen) enthält.

b) Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML315

10 µl des das Plasmid pML315 enthaltenden Gemisches (Beispiel 15a) werden für die Transformation der Calcium-behandelten E. coli HB101 Zellen verwendet. Ca. 236 Ampicillin-resistente Kolonien werden erhalten.

c) Screening der Kolonien, die F_1 - F_2 -DNA enthalten

Transformierte Kolonien (Beispiel 15b) werden auf das Vorhandensein von F_1 - F_2 -DNA geprüft, wie in Beispiel 13e) angegeben.

Es werden fünf positive Kolonien erhalten, welche die Bezeichnung pML315 - pML319 erhalten.

Beispiel 16: Herstellung des Expressionsplasmids pML320a. Ligation der synthetischen F₁-F₂-DNA mit der Vektor-DNA
pHR1148/EcoRI/BamHI

20 µg des total synthetisch hergestellten Desulfatohirudin-Gens (F₁-F₂-DNA, vgl. Beispiel 9) werden in 20 µl einer Lösung von 50 µl 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 µg/ml Gelatine mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschliessend mit BamHI verdaut. Die Lösung wird auf TNE eingestellt, woraufhin 30 µg (= 50 nMol Enden) der Vektor-DNA pHR1148/EcoRI/BamHI (vgl. Beispiel 13aD) zugegeben wird. Die Lösung wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Alkohol ausgefällt. Der DNA-Niederschlag wird, wie in Beispiel 10c) angegeben, mit T₄-DNA-Ligase (Biolabs) behandelt. Auf diese Weise entsteht in der Lösung ein rekombiniertes Plasmid (pML320), welches die F₁-F₂-DNA (Hirudin-Gen) als Insert enthält.

b. Transformation von E. coli HB101 mit dem Plasmid pML320

Die Transformation der mit Calcium behandelten E. coli HB101 Zellen erfolgt wie in Beispiel 10d) beschrieben. Es werden 10µl des in Beispiel 16a) erhaltenen Reaktionsgemisches verwendet. 173 Ampicillin resistente Kolonien werden erhalten.

c. Screening der Kolonien, die F₁-F₂-DNA enthalten

11 transformierte Kolonien (Beispiel 16b) werden, wie in Beispiel 10e) beschrieben, auf ihren F₁-F₂-DNA-Gehalt geprüft. Als radioaktive Probe wird eine Mischung der in den Beispielen 5 und 6 beschriebenen Oligodesoxynucleotide verwendet. Im Autoradiogramm werden 14 positive Kolonien erhalten. Fünf davon erhalten die Bezeichnung pML320, pML321, pML322, pML323 und pML324.

Beispiel 17: Charakterisierung der Klone pML315 und pML320

Die Charakterisierung der F_1 - F_2 -Sequenzen in den Plasmiden pML315 und pML320 erfolgt durch Sequenzierung der F_1 - F_2 -DNA nach Maxam und Gilbert (11), wie in Beispiel 12 beschrieben. Die Nucleotidsequenzen der DNA-Inserts beider Plasmide sind mit derjenigen des synthetischen Hirudin-Gens identisch.

Beispiel 18: Synthese von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität durch E. coli-Zellen, die Plasmide mit rekombinierten Hirudin-Genen enthalten

a. Synthese von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität

Jeder der 15 Klone, die das rekombinierte Desulfatohirudin-Gen enthalten, nämlich

E. coli HB101 pML 310, E. coli HB101 pML 311, E. coli HB101 pML 312,
E. coli HB101 pML 313, E. coli HB101 pML 314, E. coli HB101 pML 315,
E. coli HB101 pML 316, E. coli HB101 pML 317, E. coli HB101 pML 318,
E. coli HB101 pML 319, E. coli HB101 pML 320, E. coli HB101 pML 321,
E. coli HB101 pML 322, E. coli HB101 pML 323, E. coli HB101 pML 324

wird auf die Bildung von Hirudin-Aktivität getestet.

Zu diesem Zweck werden die oben genannten Klone in 5 ml L-Medium über Nacht (16 Stunden) bei 37°C und 250 upm kultiviert. L-Medium ist wie folgt zusammengesetzt:

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	5 g
Ampicillin	0,1 g

1 ml dieser Uebernachtkultur wird am nächsten Tag in 25 ml M9-Medium übertragen. M9-Medium ist wie folgt zusammengesetzt:

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	13,25 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,015 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g
Casaminosäuren	2,5 g
Vitamin B ₁	0,0099 g
Glucose	5,0 g
Ampicillin	0,1 g

Es wird bei 37°C und 250 upm solange kultiviert, bis die Bakterien-suspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 0,9.-1,0 erreicht hat. Anschliessend erntet man die Zellen (5 ml der wachsenden Kultur) und resuspendiert die Bakterien in 0,5 ml einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 30 mM NaCl. Danach wird die Suspension auf 1 mg/ml Lysozym (Boehringer) eingestellt und 30 min. in Eis gestellt. Durch abwechselndes Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C werden die Bakterien zerstört. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt, anschliessend wird die Mischung 30 min. bei 16000 upm bei 4°C zentrifugiert. Die Ueberstände werden auf Desulfatohirudin-Gehalt untersucht, indem man mit Antikörpern (vgl. Beispiel 18) versetzt, die Ueberstände im HPLC prüft oder die Hemmung von Thrombin (15) misst.

Folgende Resultate werden erhalten:

Bakterienextrakt	Desulfatohirudin-Bildung
<u>E. coli</u> HB101 pML 310	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 311	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 312	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 313	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 314	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 315	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 316	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 317	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 318	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 319	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 320	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 321	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 322	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 323	+
<u>E. coli</u> HB101 pML 324	+
<u>E. coli</u> HB101 pHRI 148 (Kontrolle)	-
<u>E. coli</u> HB101 pBR322 (Kontrolle)	-
<u>E. coli</u> HB101 (Kontrolle)	-

Beispiel 19 : Nachweis der Hirudin-Aktivität

Ca. 5-10 µl einer Probe, welche Polypeptide mit Hirudin-Aktivität enthält (vgl. Beispiel 18), werden auf 1 cm² Nitrocellulosepapier (NZ) (BIORAD) aufgetropft und 30 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wird das NZ für 1 Stunde bei 37°C in einer Lösung von 3 % Serumalbumin in 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl inkubiert.

Anschliessend wird das NZ in einer Lösung von 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl für 30 min. gewaschen. Dabei wird die Lösung 5 mal gewechselt. Danach wird das gewaschene NZ für 2 Stunden bei 25°C in einer Lösung von 3 % Serumalbumin in 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und

0,9 % NaCl, die 2 µg/ml Antikörper (aus Kaninchen hergestellte, oder monoklonale Antikörper) gegen Hirudin enthält, behandelt. Danach wird das NZ, wie oben beschrieben gewaschen.

Anschliessend wird das NZ für 2-3 Stunden bei 25°C mit einer Lösung von 3 % Serumalbumin in 0,01 M Tris-HCl (pH 8) und 0,9 % NaCl, die 0,2 µCi/ml ¹²⁵I-Protein A (sp. Aktivität 89,8 µCi/mg) (NEN) enthält, behandelt. Danach wird abermals das NZ, wie oben beschrieben, gewaschen, getrocknet und in einem γ-Zähler (Multi Gramma, 1260 gamma counter, LKB, Wallace) die gebundene Radioaktivität bestimmt, welche ein Mass für das auf dem NZ vorhandene Polypeptid mit Hirudin-Aktivität ist.

In einem alternativen Verfahren wird obige Probe einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) unterworfen [vgl. (24)]. Das PAGE-Elektropherogramm wird durch Elektro-Blotting auf NZ übertragen. Danach wird die NZ wie oben beschrieben behandelt und/oder über Nacht zusammen mit einem Röntgenfilm (Fuji) autoradiographiert. Stellen auf dem NZ, welche Polypeptide mit Hirudin-Aktivität enthalten, erscheinen auf dem Film als schwarze Flecken.

Beispiel 20: Isolierung und Reinigung von Desulfatohirudin mit Hilfe einer Thrombin-Säule

a. Herstellung der Polypeptidlösung für die Thrombin-Säule.

150 ml Kulturbrühe (erhalten gemäss Beispiel 18) werden auf 4°C abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (5000 upm, 15 min., Sorvall RC 3B) abgetrennt. Der klare Ueberstand enthält keine Hirudin-Aktivität.

Anschliessend werden die Zellen in 12 ml Lyse Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 30 mM NaCl) suspendiert. Dieser Mischung werden 15 mg Lysozym (Boehringer) zugesetzt und diese dann 30 min. bei 4°C aufbewahrt. Anschliessend werden die Zellen durch 4 maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschliessendem Auftauen bei 37°C zerstört. Danach wird 30 min. bei 16000 upm 4°C zentrifugiert. Der Ueberstand enthält die Hirudin-Aktivität. In dem Ueberstand (15 ml) werden dann

7,7 g festes Ammoniumsulfat aufgelöst. Die trübe Mischung wird bei 4°C für 30 min. stehengelassen und dann zentrifugiert (s. oben). Das nasse Sediment wird in 1 ml 0,05 mM Tris-HCl pH 8 Puffer gelöst und man erhält die gewünschte Polypeptidlösung.

b. Reinigung von Hirudin auf einer Thrombin-Säule.

Die Thrombin-Säule (Bettvolumen 4 ml) ist mit 0,05 M Tris-HCl pH 8 äquilibriert. 5 ml-Portionen der oben erhaltenen Polypeptid-Lösung werden bei 4°C auf die Säule mit einer Fliessgeschwindigkeit von 7 ml/Stunde aufgetragen. Gewaschen wird dann mit 25 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 8). Die ersten Fraktionen enthalten die nicht adsorbierten Polypeptide, welche verworfen werden. Anschliessend wird die Säule mit 10 ml 1,5 M Benzamidin (Merck) [vgl. (25)] in 0,05 M Tris-HCl (pH 8) gewaschen und die erhaltenen Fraktionen auf Hirudin-Aktivität mit dem Thrombin-Test (15) geprüft. Die Fraktionen, welche die Polypeptide enthalten, werden durch Messung der OD_{280nm} bestimmt. Fraktionen 25 und 26 enthalten die Hirudin-Aktivität; sie werden bei -20°C aufbewahrt oder bis zur Weiterverarbeitung im Eisbad. Die Hirudin-Aktivität beträgt in Fraktion 25 20 µg/ml und in Fraktion 26 52 µg/ml. Danach werden die Fraktionen dialysiert oder über Sephadex-G25 (Pharmacia) entsalzt.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (24) des Produktes ergibt ein Molekulargewicht von ca. 7000-8000 Dalton und ganzzahlige Vielfache davon (Oligomere).

c. Herstellung der Thrombin-Säule

Affi-Gel 10 (Bio Rad) wird nach Angaben des Herstellers mit kaltem destilliertem Wasser und Kupplungspuffer pH 8,5 (0,1 M NaHCO₃/Na₂CO₃-Lösung) gewaschen. Eine 50 %ige Suspension der Gels in Kupplungspuffer (4 ml) wird in ein Plastikrohr übertragen, mit der gleichen Menge Thrombinlösung (120 mg in 4 ml Kupplungspuffer) (Calbiochem) vermischt und über Nacht bei 4°C rotiert. Danach wird das Gel mit Kupplungspuffer gewaschen. Zur Blockierung der noch freien aktiven Stellen wird das Gel mit 0,1 ml 1 M Aethanolamin-HCl (pH 8,0) pro Gel während 3 Stunden bei 4°C behandelt dann mit phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 10 mM Natriumazid pro ml

Gel gewaschen und darin bei 4°C gehalten. Der Kupplungsgrad wird durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt und beträgt 15 bis 30 mg Hirudin pro ml Gel.

4 ml des entstandenen Thrombin-Gels werden verwendet, um die Affinitätssäule herzustellen.

Beispiel 21: Transformation verschiedener E. coli-Stämme mit dem Plasmid pML310 und Kultivierung der transformierten Wirtszellen

In analoger Weise, wie in Beispiel 10d) beschrieben, werden die Stämme E. coli JA221, E. coli LM1035 und E. coli W3110Δ102 mit dem Plasmid pML310 transformiert. Transformierte Kolonien werden auf das Vorhandensein von F₁-F₂-DNA geprüft, wie in Beispiel 10e) beschrieben. Es werden 5, 3 bzw. 5 positive Kolonien erhalten, die die folgenden Bezeichnungen erhalten:

E. coli JA221/pML310/1
E. coli JA221/pML310/2
E. coli JA221/pML310/3
E. coli JA221/pML310/4
E. coli JA221/pML310/5
E. coli LM 1035/pML310/1
E. coli LM 1035/pML310/2
E. coli LM 1035/pML310/3
E. coli W3110Δ102/pML310/1
E. coli W3110Δ102/pML310/2
E. coli W3110Δ102/pML310/3
E. coli W3110Δ102/pML310/4
E. coli W3110Δ102/pML310/5

Die genannten Klone werden in einem modifizierten M9-Medium kultiviert, welches die folgende Zusammensetzung aufweist:

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	9,0	g
KH ₂ PO ₄	3,0	g
NaCl	0,5	g
NH ₄ Cl	3,5	g

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,015	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25	g
Casaminosäuren	7,0	g
Hefeextrakt	5,0	g
Vitamin B ₁	0,0099	g
Eisen-III-citrat	0,006	g
MOPS (3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure)	34,0	g
Glucose	20,0	g
Ampicillin	0,1	g

Es wird bei 37°C und 180 upm solange kultiviert, bis die Bakterien-suspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 1 erreicht hat. Anschliessend erntet man die Zellen (5 ml der wachsenden Kultur) und resuspendiert die Bakterien in 0,5 ml einer Lösung von 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 30 mM NaCl. Danach wird die Suspension auf 1 mg/ml Lysozym (Boehringer) eingestellt und 30 min. in Eis gestellt. Durch abwechselndes Einfrieren der Suspension in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C werden die Bakterien zerstört. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt. Anschliessend wird die Mischung 30 min. bei 16000 upm bei 4°C zentrifugiert.

Alle Klone werden auf die Bildung von Polypeptiden mit Hirudin-Aktivität untersucht, in dem die Hemmung von Thrombin (15) gemessen wird. In allen Bakterienextrakten wird Hirudin-Aktivität (300-600 ng/ml Kulturlösung) festgestellt. Beispielsweise werden folgende Hirudin-Aktivitäten bestimmt:

Stamm	Hirudin-Aktivität ($\mu\text{g}/1$ Kulturlösung)
<u>E. coli</u> LM1035/pML310/1	300
<u>E. coli</u> JA 221/pML310/1	500
<u>E. coli</u> W3110Δ102/pML310/1	600

Beispiel 22: Fermentation des transformierten Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 im 5000 l Fermenter und Aufarbeitung der Kulturbrühe

In analoger Weise, wie in Beispiel 21 beschrieben, werden in einem 5000 l Fermenter E. coli W3110Δ102/pML310/1-Zellen in 3000 l modifiziertem M9-Medium kultiviert, bis die Suspension eine optische Dichte (OD_{623}) von ca. 10-13 erreicht hat.

Die Kulturbrühe (pH 7,4) wird auf 10°C abgekühlt, und die Zellen werden mit einer Alfa-Laval BRPX-207 Entschlammvorrichtung behandelt. Der klare Ueberstand enthält keine Hirudin-Aktivität und wird verworfen. Während der Entschlammung wird der Schlamtraum fortwährend mit Lysepuffer A (50 mM Tris-HCl, 30 mM NaCl, eingestellt mit HCl auf pH 8,0) teilentschlammt und am Schluss der Inhalt der Zentrifugenschale (7 l) unter voller Entschlammung mit Lysepuffer A ausgestossen. Die erhaltene Zellmasse wird mit Puffer A auf 375 l eingestellt und besitzt einen pH-Wert von 7,6. Nach dem Kühlen auf 5-10°C wird die Suspension durch eine Dyno-Mühle (Typ KD5) geleitet, welche mit 4,2 l Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,5-0,75 mm ausgerüstet ist. Dabei werden die Zellen zerstört. Die so erhaltene Suspension wird mit Essigsäure auf einen Essigsäuregehalt um 2 % (v/v) eingestellt und über Nacht bei 10°C gerührt. Die Suspension mit einem pH von 3,9 wird mit der oben beschriebenen Technik entschlammt. Der klare Ueberstand von 300 l wird in einem Fallfilmverdampfer (Stundenleistung 60 l Wasser) auf 35 l aufkonzentriert. Das leicht trübe Konzentrat wird zentrifugiert und der so erhaltene klare Ueberstand auf einer Ultrafiltrationsanlage

DDS = Lab 35, welche mit GR 81 PP Membrane bestückt ist (Fläche 2,5 m²), gegen 2 % Essigsäure oder 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 Puffer diafiltriert. Das Endvolumen beträgt 31 l.

Ein aliquoter Teil von 2 l dieser klaren Proteinlösung wird auf eine Sephadex G-50 F-Säule (KS 370 Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 96 l aufgetragen, wobei die Säule mit 2 % Essigsäure äquilibriert ist. Die in 15 l Eluat enthaltene Hauptfraktion wird mittels Ultrafiltration eingeengt und anschliessend gegen Wasser diafiltriert. Die so erhaltene klare wässrige Lösung wird lyophilisiert. Die Aufarbeitung kann, wie in den folgenden Beispielen beschrieben, durchgeführt werden.

Beispiel 23: Kultivierung des Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 im
Labormassstab

Der Stamm E. coli W3110Δ102/pML310/1 wird bei 37°C und 200 upm 24 Stunden in Schüttelkolben inkubiert. Das Medium weist folgende Zusammensetzung auf (g/l):

Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	9,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0
NaCl	0,5
CaCl ₂	0,015
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25
Eisen(III)-citrat	0,006
MOPS	40
NH ₄ Cl	3,5
Casamino Säuren	7,0
Hefeextrakt	5,0
Cerelose (Glucose)	20
Ampicillin	0,1

Das Medium hat einen pH-Wert von 6,54. Während der Kultivierung wird eine optische Dicke (OD_{605nm}) von 14,9 erreicht.

Die Zellen (50 ml der wachsenden Kultur) werden geerntet und in 5 ml einer Lösung von 50 mM Tris • HCl (pH 8.0) und 30 mM NaCl resuspendiert. Danach wird die Suspension mit 5 g gekühlten Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm), oder durch Zugabe von Lysozym (Boehringer), Endkonzentration 1 mg/ml, während 30 bis 45 Minuten in Intervallen auf einem Multi-Tube Vortexer bei hoher Intensität geschüttelt. Zu 0,5 ml der Mischung werden 0,5 ml 2 % Essigsäure zugegeben und die Mischung wird 20 min bei 4°C und 12'000 upm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird auf Hirudin-Aktivität (Hemmung von Thrombin) geprüft. Der Thrombin-Hemmtest wird wie folgt durchgeführt:

Der Test beruht auf der Bestimmung der enzymatischen Abspaltung von p-Nitroanilin aus dem Substrat Chromozym TH (Tosyl-glycyl-prolyl-arginin-4-nitroanilid-acetat). Das gebildete p-Nitroanilin wird kolorimetrisch bei 405 nm gemessen (Micro-Elisa Auto Reader von Dynatech, Kloten). Der Test wird in Mikrotiterplatten mit flachem Boden (Costar, Serocluster, Catalog Nr. 3590) durchgeführt. Die Reaktionszeit beträgt 2 h bei 37°C im Brutschrank. Für den Test werden 20 µl der zu bestimmten Lösung mit 30 µl Füllpuffer (0,2 M Tris•HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 100 µg/ml Rinderserumalbumin) verdünnt und mit 20 µl Enzym-Lösung [10 mg lyophilisiertes Thrombin aus Humanplasma (Boehringer) in 1 ml bidestilliertem Wasser gelöst und ca. 1:400 mit obigem Füllpuffer verdünnt] und mit 150 µl Substrat-Lösung [20 ng Chromozym TH (Boehringer) in 4 ml bidestilliertem Wasser gelöst und 1:15 mit obigem Füllpuffer verdünnt] versetzt. Alle Lösungen werden gegen eine Blank-Lösung, bestehend aus 70 µl Füllpuffer (s.o.) und 150 µl Substrat-Lösung und gegen eine Enzym-Kontrolllösung, bestehend aus 50 µl Füllpuffer, 20 µl Enzym-Lösung und 150 µl Substrat-Lösung gemessen. Der OD_{405nm}-Wert der Enzym-Kontrolllösung nach 2 h bei 37°C ergibt 100 % Aktivität und sollte ca. 0,8 ± 0,2 betragen. Die Thrombin-Hemmung (in %) der Proben errechnet sich nach der Formel

$$\% \text{-Thrombin-Hemmung} = 100 - \frac{100 \times \text{OD}_{405\text{nm}} \text{ der Probe}}{\text{OD}_{405\text{nm}} \text{ der Enzym-Kontrolllösung}}$$

Die überstehende Lösung weist eine Thrombin-Hemmung von 49,7 %/20 µl auf.

Beispiel 24: Reinigungsverfahren zur Anreicherung von Hirudin-Verbindungen aus Kulturbrühen

In analoger Weise wie in Beispiel 22 beschrieben, wird der Stamm E. coli W3110Δ102/pML310/l im Fermenter kultiviert. Dann werden die Zellen aufgeschlossen, abzentrifugiert und der aufkonzentrierte Ueberstand nach Essigsäurebehandlung ultrafiltriert oder dialysiert. Solcherart gewonnene Lösungen können beispielsweise mittels Ionen-austauschchromatographie gereinigt werden.

a) Anionenaustauschchromatographie über eine MONO Q Säule (Pharmacia) zur Gewinnung von Thrombin hemmenden Fraktionen)

8,5 ml Proteinlösung (20 mM Tris • HCl pH 7,5/150 mM NaCl) werden auf die Mono Q Säule mittels eines Chromatographiesystems der Fa. Pharmacia ("fast protein liquid chromatography" FPLC) aufgetragen und bei folgenden Bedingungen eluiert.

Experimentelle Bedingungen: Säule: Mono Q, 4,6mm x 150 mm.
 Puffer A: 20 mM Tris • HCl pH 7,5; Puffer B: 20 mM Tris • HCl/1 M NaCl. Linearer Salzgradient: A: während 9 ml mit 15 % Puffer B eluieren, während 10,7 ml auf 70 % Puffer B steigern. AUFS 1.0 bei 280 nm, 1 ml Fraktionen.

Im Ausschlussvolumen (Fraktionen 1-10) wird ein grosser Proteingipfel von den nachfolgend eluierenden Hirudin-Verbindungen abgetrennt. Die Fraktionen 17-23 zeigen im Thrombin-Test eine Thrombin-Hemmung zwischen 20 und 100 %, wobei die Hauptfraktion (Fraktionen 20 und 21) mit 92 % Hemmung, bei einer Konzentration von ca. 500 mM NaCl eluiert.

b) Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE Cellulose-Säule zur Anreicherung von Hirudin Verbindungen.

10 ml eines Dialysats wird der Anionenaustauschchromatographie an DE 53 (Fa. Whatman) bei pH 7,5 unterworfen (Chromatographiebedingungen: Säule 1 x 5 cm (10 ml). Elutionspuffer A: 20 mM Ammoniumacetat, 100 mM NaCl, pH 7,5. Elutionspuffer B: 20 mM Ammoniumacetat 1 M NaCl, pH 4,0. Linearer Salzgradient je 4 Säulenvolumen Puffer A, resp. B). Hirudin-Verbindungen eluieren ab 0,4 M NaCl. Der Nachweis gelingt mit dem Thrombin-Hemmtest.

c) Entsalzung an P-6 DG "Desalting Gel" (Fa. Bio-Rad)

110 ml Dialysat (20 mM Tris • HCl, pH 7,5, konzentrierte Proteinlösung aus 2,6 l Ueberstand) wurden in analoger Weise wie in Beispiel 24b beschrieben an DE 53 getrennt. Hirudin-Verbindungen eluieren zwischen Fraktionen 46 und 52 (150 ml), getrennt von verschiedenen, rascher eluierenden nicht-aktiven Proteingipfel, und werden am Rotationsverdampfer auf ca. 12 ml konzentriert. Die so erhaltene, klare Proteinlösung wird auf eine Biogel P-6 DG Säule aufgetragen und wässrig eluiert.

Experimentelle Bedingungen: Säule 2,5 x 9 cm, stationäre Phase 45 ml Biogel P-6 DG Desalting Gel, Durchflussgeschwindigkeit 1,15 ml/min, 4,6 ml Fraktionen. Der Salzgehalt kann durch Leitfähigkeitmessung oder Testierung mittels Silbernitrat (AgCl-Fällung) überprüft werden. Die Hauptaktivität eluiert zwischen den Fraktionen 7 bis 10, wobei der Nachweis mittels dem Thrombin Hemmtest gelingt. Die Fraktionen 8-10 (13,5 ml) werden vereinigt, am Rotationsverdampfer auf 1 ml aufkonzentriert und die klare Lösung auf eine Sephadex G 50 fine-Säule (Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 160 ml aufgetragen, wobei die Säule mit 1 % Essigsäure äquilibriert ist.

d) Gelfiltration an Sephadex G50 fine (Fa. Pharmacia)

Experimentelle Bedingungen: Säule: Sephadex G50 fine (31 g). 2,5 cm x 64 cm, Volumen 310 ml; Lösungsmittel: 1 % Essigsäure; Durchflussgeschwindigkeit 43 ml/h, 3,8 ml Fraktionengröße. AUFS:

0,1 bei 282 nm. Papiervorschub 3,0 cm/h. Der Nachweis der eluierten Aktivität erfolgt mit dem Thrombin-Hemmtest. Die in 50 ml Eluat (Fraktionen 39-52) enthaltene Hauptfraktion eluiert rascher als nicht-aktive Nebenkomponenten. (Fraktionen 53 bis 80). Die Thrombin-Hemmung der aktiven Fraktionen beträgt zwischen 80 und 100 % Hemmung.

e) Kationenaustauschchromatographie an einer CM-Cellulose zur Voranreicherung von aktiven Lysaten

10 ml Dialysat [20 mM Tris + HCl, Konzentrat (1:20) aus 200 ml Ueberstand, pH 2,0 eingestellt mit 3 ml 4N HCl] wurden auf einem Kationentauscher (CM-Cellulose) getrennt. Hirudinverbindungen eluieren im Ausschlussvolumen zwischen Fraktionen 4-8. Der Nachweis erfolgt mittels des Thrombin-Hemmtests. Die Fraktionen 5 und 6 hemmen zu 89 %, respektive 88 % pro 20 µl Eluat.

Experimentelle Bedingungen: Säule: 1,5 x 8 cm, stationäre Phase: 19 ml CM-Cellulose (los MZ-3146). Durchflussgeschwindigkeit: 43 ml/h, 3,8 ml Fraktionen. Linearer Salzgradient Puffer A: 20 mM NH₄OAc, pH 2 eingestellt mit 4N HCl, Puffer B: 200 mM NH₄OAc pH 6,5, je 5 Säulenvolumen, AUFS 1,0 bei 282nm.

Beispiel 25: Fermentation des transformierten Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 und Aufarbeitung der Kulturbrühe

In analoger Weise wie in Beispiel 22 beschrieben, werden in einem Fermenter E. coli W3110Δ102/pML310/1 Zellen in 8 l Medium L während 5 h kultiviert, wobei die Suspension eine optische Dichte (OD₆₂₃) von ca. 5 erreicht hat.

Die aus der Kulturbrühe (pH 7,2) abzentrifugierten Zellen werden auf 10°C abgekühlt, durch Lysozymbehandlung und durch mehrmaliges (4x) abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf ca. 30°C aufgeschlossen. Die so erhaltene Suspension (2,5 l) wird mit 1,5 % Essigsäure (2,4 l) verdünnt und 30 min. bei 4°C gerührt. Die ausgefallenen bakteriellen Proteine und andere Zellbestandteile werden für 30 min. bei 4°C bei 9000 Upm abzentrifugiert. Der klare

Ueberstand von 3,2 l wird in einem Rotationsverdampfer (Fa. Büchi) auf 320 ml aufkonzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht gegen 20 mM Tris + HCl pH 7.5 bei 4°C dialysiert und das leicht trübe Dialysat nochmals zentrifugiert. Das Endvolumen beträgt 300 ml. Die klare Proteinlösung (0,02 M Tris + HCl pH 7,0) wird auf eine Diäthylaminoäthyl-cellulose-(DE53 der Fa. Whatman) (20 g) Säule mit einem Bettvolumen von 20 ml aufgetragen, wobei die Säule mit Puffer A äquilibriert ist (Puffer A: 20 mM Ammoniumacetat/100 mM NaCl, pH 7,5). Vorerst wird mit 1 Säulenvolumen (45 ml) bei konstantem Fluss (43 ml/h) gewaschen und anschliessend mit einem linearen Salzgradienten mit je fünf Säulenvolumen Puffer A, respektive Puffer B eluiert (Puffer B: 20 mM Ammoniumacetat/4 M NaCl, pH 5,0). Die in 100 ml Eluat enthaltene, im Thrombin-Hemmtest aktive Hauptfraktion (Fr. 24-26) wird über Nacht bei 4°C gegen 20 mM Tris + HCl pH 7,5 dialysiert und anschliessend am Rotationsverdampfer bei 35°C auf 5 ml Endvolumen aufkonzentriert.

Die so erhaltene klare wässrige Lösung wird auf eine Sephadex G-50 fine Säule (Pharmacia) mit einem Bettvolumen von 160 ml aufgetragen, wobei die Säule (2,5 x 64 cm Biorad) mit 5 % Essigsäure äquilibriert ist. Die in 50 ml Eluat (Fraktionen 5-7, Fluss 50 ml/h, 25 min./Fraktion) enthaltene Hauptaktivität wird am Rotationsverdampfer eingengt und anschliessend einer "Reverse Phase" HPLC-Trennung unterworfen. Ein Aliquot (500 µl) der einzelnen Fraktionen wird am "speed vac" Konzentrator (Fa. Savant) 1:10 konzentriert und mittels der "Reversed Phase"-HPLC-Analyse auf ihren Gehalt an Desulfato-hirudin-Verbindungen untersucht. Die Lösungen enthalten Desulfato-hirudin-Verbindungen. Fraktion 6 (18 ml) enthält prozentual den geringsten Anteil an Nebenkomponenten und wird mittels semipräparativer "Reversed Phase"-HPLC weiter gereinigt.

Experimentelle Bedingungen: Vydac 218 TP 510 RP-HPLC-Säule, 10 x 250 mm; Aliquote Anteile der Fraktion 6 (200 µl 1:10 konzentriert) pro Trennung; AUFS 0,5 bei 220 nm; Durchflussgeschwindigkeit: 2 ml/min. Eluent: A:0.1 % Trifluoressigsäure, B:Acetonitril/Wasser 8:2 + 0.07 % Trifluoressigsäure, 1 min 16 % B, dann

während 40 min auf 64 % B steigen. Die so erhaltenen Fraktionen werden 1:1 mit Wasser verdünnt und lyophilisiert. Der Rückstand besteht aus reinen Desulfatohirudin-Verbindungen.

Beispiel 26: Analyse des Produktgemisches aus der Fermentation von
E. coli W3110Δ102/pML310/1

Die gemäss Beispiel 25 erhaltenen, im Thrombin-Hemmtest aktiven Fraktionen werden einer HPLC-Analyse unter zwei verschiedenen Bedingungen unterworfen.

a) Experimentelle Bedingungen Nr. 1: Nucleosil (MN) C18, 5 µm RP-HPLC Säule, 4,6 x 120 mm; 50 µl Hirudin-Verbindungen pro Trennung, Att. 6 bei 214 nm; Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A:0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 mit 0,07 % Trifluoressigsäure, 2 min 16 % B, dann während 30 min. auf 64 % B steigern. Gegendruck: 107 bar.

In einminütigem Abstand werden Fraktionen genommen (insgesamt 30), die dem Thrombin-Hemmtest und dem Antikörpertest (vgl. Beispiel 19) unterworfen werden. Fraktionen 12-15 erweisen sich als aktiv. Ausserdem werden die Aminosäurezusammensetzung, der N-Terminus und der C-Terminus für die aktive Hirudin-Verbindung der Fraktion 14 bestimmt. Diese Fraktion (Nr. 14) wird zudem mit Desulfatohirudin verglichen, welches analog wie in Beispiel 28 beschrieben durch Umsetzung von natürlichem Hirudin aus Blutegel mit dem Enzym Arylsulfatase erhalten wird. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefasst:

Tabelle 1:

Faktion	Retentionszeit (min)	Thrombin- Hemmung (%)	Antikörper Test Δ (cpm)
Fr 12	11,75	+	35
Fr 13	12,50	++	+
Fr 14	12,80	++	79
Fr 15	13,14	+	27
Kontrolle	-	-	9 13850 - 12440 250
Desulfato- Hirudin	12,8	++	86

Fraktionen des Kontrollstammes E. coli W3110Δ102 ("Kontrolle") sind weder im Thrombin-Hemmtest noch im Antikörpertest aktiv. Solche Fraktionen werden erhalten durch Kultivierung des nicht-transformierten Stammes E. coli W3110Δ102 unter den gleichen Bedingungen, wie in Beispiel 22 beschrieben, und durch Aufarbeitung der Kulturbrühe gemäss Beispiel 25.

b.) Experimentelle Bedingungen Nr. 2: RP-HPLC Säule, Vydac 218 TP 5415 4,6 x 150 mm; 100 µl (1:10 Konz.) Fraktion 6 (vgl. Beispiel 25) pro Trennung; AUFS 0,1 bei 214 nm; Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07 % Trifluoressigsäure. Gradient: 2 min 16 % B, dann während 3 min. auf 20 % B steigern, dann während 15 min auf 25 % B steigern, dann während 27 min. auf 64 % B steigen. Gegendruck 160 bar.

In der folgenden Tabelle 2 sind die im Thrombin-Hemmtest und im Antikörpertest aktiven Fraktionen aufgelistet. Die Tabelle enthält weiterhin die Konzentrationen an NaCl in mM, die zur Eluierung der Fraktionen von einer Mono Q-Säule (Anionenaustauschchromatographie) erforderlich sind (vgl. Beispiel 24a), sowie die langwelligsten

UV-Absorptionsbanden einiger Fraktionen. Alle Fraktionen zeigen zudem eine positive Reaktion mit anti-Hirudin-Antikörpern (vgl. Beispiel 30).

Tabelle 2

Fraktion Nr.	Reten- tions- zeit (min.) RP-HPLC	Thrombin- Hemmung %	Anti- körper Test Δ/cpm	FPLC	UV(λ_{max}) mM NaCl	Ausbeute μg
1	15,63	97,8 \pm 2	16'196	350	223a,274	4
2	16,83	91,9 \pm 2	14'157	390	275	1.6
3	18,43	79,9 \pm 2	9'257			1
4	19,6	81,7 \pm 5	11'877	420		1.5
5	20,6	50,4 \pm 5	7'647	460		1.5
6	21,53	66,1 \pm 5	9'584	500	273	1.5
Kontrolle	-	0	508		-	-
PBS- Puffer	-	-	66			-
Desulfato- Hirudin	15,45	97,3 \pm 2	15'400	350	274	ca. 4

Beispiel 27: Charakterisierung von Desulfatohirudin-Verbindungen aus der Fermentation des Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1

I. Die Hirudin Verbindung aus Fraktion 14 (vgl. Beispiel 26 unter "Experimentelle Bedingungen Nr. 1", Tabelle 1) oder Fraktion 1 (vgl. Beispiel 26 "Experimentelle Bedingungen Nr. 2", Tabelle 2) wird wie folgt charakterisiert:

a) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Ca. 2,5 μg Hirudin-Verbindung werden mit 6 N HCl bei 110°C während 24 h hydrolysiert und dann nach Chang et al. (DABS-Cl-Methode) (Zitat 31) analysiert. Das Hydrolysat weist die folgende Zusammensetzung auf.

Aminosäure	Hydrolisat		Aminosäure	Hydrolisat	
Asp	9,8	(9)	Ile	1,8	(2)
Thr	4,2	(4)	Leu	3,9	(4)
Ser	4,4	(4)	Tyr	1,5	(2)
Glu	12,6	(13)	Phe	1	(1)
Pro	3,7	(3)	His	1,1	(1)
Gly	9,3	(9)	Lys	3,4	(3)
Val	3,5	(4)	Met	0	(0)
Cystin	2,2	(3)	Total		(65)

b) Partielle Sequenzanalyse

5 µg (750 pMol) der Hirudin-Verbindung wird einer klassischen Sequenzanalyse nach Edman unterworfen und die N-terminalen Phenylthiohydantoin (PTH)-aminoäuren mittels RP-HPLC bestimmt.

Ergebnis:

Cyclus	1	5	10							
Aminosäure	Val	Val	Tyr	Thr	Asp	n.b.	Thr	Glu	Ser	Gly

Cyclus	11	15					
Aminosäure	Gln	Asn	Leu	n.b.	Leu	n.b.	Glu

(n.b. nicht bestimmt).

Die N-terminale Sequenz der untersuchten biosynthetischen Hirudin-Verbindung ist somit identisch mit derjenigen des natürlichen Hirudins (Zitat 1).

c) Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren mittels Carboxypeptidase Y-Abbau

Der zeitabhängige Abbau der C-terminalen Aminosäuren mit Carboxypeptidase Y ergibt als C-Terminus

Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mit dem Aminosäureanalysator. Es ergibt sich, dass Tyr⁶³ nicht sulfatiert ist (Desulfato-hirudin!).

Bei dem Hauptprodukt der Fermentation des transformierten Stammes E. coli W3110Δ102/pML310/1 handelt es sich, wie die Strukturdaten und der Vergleich mit aus natürlichem Hirudin gewonnenen Desulfato-hirudin beweisen, um Desulfatohirudin.

II. Die Struktur der übrigen Fermentationsprodukte ist noch nicht vollständig geklärt. Bei den Fraktionen 2-6 (vgl. Tabelle 2) handelt es sich um definierte Verbindungen, die anhand der HPLC- und FPLC-Daten sowie des UV-Absorptionsmaximums ausreichend definiert sind. Mit Sicherheit handelt es sich bei diesen Verbindungen um Desulfatohirudin-ähnliche Verbindungen, die sich von Desulfatohirudin durch eine strukturelle Mikroheterogenität (z.B. unterschiedliche verknüpfte S-S-Brücken) oder durch Modifikation am N- bzw. C-Terminus unterscheiden (z.B. N-terminaler Methionyl-Rest oder N-terminal acyliert, wie formyliert oder acetyliert).

Auch bei der Fermentation der Stämme E. coli LM1035/pML310/1, E. coli JA221/pML 310/1 und E. coli HB101/pML310 kann Desulfatohirudin als Hauptprodukt identifiziert werden.

Beispiel 28: Herstellung von Desulfatohirudin aus natürlichem Hirudin zu Vergleichszwecken

Natürliches Hirudin wird zu 2 mg/ml Puffer (0,1 M Ammoniumacetat, pH 5,5) gelöst. Zu 20 µg Hirudin (10 µl Lösung) werden 100 µl einer entsalzten Arylsulfatase (Boehringer)-Lösung gegeben, die 16 µg Arylsulfatase enthält. Man inkubiert bei 25°C und verfolgt die Umsetzung mittels HPLC-Analyse. Nach 6 Stunden Inkubation sind über 90 % des Hirudins desulfatiert. Die Retentionszeit des gebildeten Desulfatohirudins beträgt unter den in Beispiel 26 ("Experimentelle Bedingungen a":) beschriebenen Bedingungen 12,8 min. und unter den in Beispiel 26 ("Experimentelle Bedingungen b") beschriebenen Bedingungen 15,45 min.

Die Aminosäurezusammensetzung, die Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau und die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren durch Carboxypeptidase Y-Abbau ergeben das für Desulfatohirudin erwartete Ergebnis.

Beispiel 29: Expression von Desulfatohirudin-Verbindungen in Hefe (S. cerevisiae)

Die Expression von Fremdproteinen in Hefe erfordert ein definiertes Expressionssystem. Es soll einen starken Hefe-Promoter, bevorzugt einen induzierbaren Hefe-Promoter, und geeignete Transkriptionsstopsignale auf einem Plasmidvektor enthalten, mit dem Hefezellen transformiert werden können. Der Vektor enthält auch DNA-Sequenzen, bevorzugt Hefe 2µ Sequenzen, die extrachromosomal Replikation mit hoher Kopienzahl gewährleisten. Er soll außerdem einen Selektionsmarker für Hefe, bevorzugt das Hefe LEU2 Gen, und pBR322 DNA Sequenzen mit Replikationsursprung und Selektionsmarker, bevorzugt das Ampicillin-Resistenzgen, für die Verwendung in E. coli enthalten. Solche Vektoren sind als sog. Shuttle-Vektoren für die Vermehrung in E. coli und Hefe geeignet.

Ein Expressionssystem, das diese Voraussetzungen erfüllt, ist in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 100,561 beschrieben und mit Beispielen für effiziente Expression in Hefe belegt. Fremdgene werden unter der Kontrolle des induzierbaren PHO5 Promoters der sauren Phosphatase aus Hefe exprimiert. PHO5 Promoter, Fremdgen und PHO5 Transcriptionsstop sind in Serie in dem Hefe Vektor pJDB207 integriert, der auch DNA Sequenzen des Hefe 2 μ Plasmids, das Hefe LEU2 Gen, das Ampicillin Resistenzgen und den E. coli Replikationsursprung enthält.

Das Expressionsplasmid pJDB207R/PHO5-HIR wird wie folgt hergestellt:

a) Isolierung des pJDB207 Vektor Fragments:

6 μ g des Plasmids pJDB207R/IF(α -3) (EP 100,561) werden mit der Restriktionsendonuclease BamHI komplett verdaut. Die entstehenden DNA Fragmente (6,85 kb und 1,15 kb) werden mit Aethanol gefällt und in 400 μ l 50 mM Tris-HCl pH 8.0 aufgenommen. 4,5 Einheiten Kälberdarm-Phosphatase (Boehringer, Mannheim) werden zugegeben. Die Mischung wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert, danach wird die Phosphatase bei 65°C für 1,5 Stunden inaktiviert. Die Lösung wird auf 150 mM NaCl gebracht und dann auf eine DE52 (Whatman) Anionenaustauschersäule (100 μ l Volumen) aufgetragen, die vorher mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibriert wurde. Nach einem Waschgang mit demselben Puffer wird die DNA mit 400 μ l 1,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA eluiert und mit Aethanol gefällt. Das grosse 6,85 kb BamHI Fragment wird vom kleinen Fragment auf einem 1,2 %igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 abgetrennt.

b) Isolierung des 534 bp PHO5 Promoter Fragments

6 μ g des Plasmids p31/R (EP 100,561) werden mit den Restriktionsendonucleasen EcoRI und BamHI verdaut. Die entstehenden 3 DNA Fragmente werden auf einem 1,2 %igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA

Puffer pH 8,3 getrennt. Das 534 bp BamHI-EcoRI Fragment wird isoliert. Es enthält den PHO5 Promoter einschliesslich der Transkriptionsstartstellen.

c) Isolierung eines 206 bp DNA Fragments mit der für Hirudin kodierenden Sequenz

9 µg des Plasmids pML310 (vgl. Beispiel 13c) werden mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI komplett verdaut. Die entstehenden zwei DNA Fragmente werden auf einem 1,2 %igen Agarosegel in Tris-Borat-EDTA Puffer pH 8,3 getrennt. Das 206 bp EcoRI-BamHI Fragment wird isoliert.

d) Ligierung der DNA Fragmente:

Die drei in Abschnitt a-c (s.o.) erwähnten DNA Fragmente werden aus Agarosegelblöcken durch Elektroelution gewonnen, über DE52 (Whatman) Anionen-Austauscher gereinigt, mit Aethanol gefällt und in H₂O resuspendiert.

0,1 pMol (0,45 µg) des 6,85 kb BamHI Vektor Fragments, 0,3 pMol (0,1 µg) des 534 bp BamHI-EcoRI PHO5 Promoter Fragments und 0,25 pMol (34 ng) des 206 bp EcoRI-BamHI Fragments von pML310 werden in 15 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP mit 600 Einheiten T4 DNA Ligase (Biolabs) bei 15°C für 16 Stunden ligiert.

24 transformierte, amp^R Kolonien werden getrennt in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Plasmid DNA wird nach der Methode von Holmes et al. (32) isoliert und durch einen HindIII/EcoRI Doppelverdau analysiert. Das Auftreten eines ca. 600 bp grossen EcoRI-HindIII Fragments zeigt an, dass bei dem betreffenden Klon das PHO5 Promoter-Hirudin DNA Fragment in der richtigen Orientierung zu den Transkriptionsstopsignalen auf dem Vektor vorliegt. Wie erwartet haben etwa 50 % der Klone die richtige Orientierung des Inserts. Einer dieser Klone wird als pJDB207R/PHO5-HIR bezeichnet.

e) Transformation von Saccharomyces cerevisiae GRF18:

Saccharomyces cerevisiae Stamm GRF18 (α , his3-11, his3-15, leu2-3, leu2-112, can^R) wird mit dem Plasmid pJDB207R/PHO5-HIR nach dem Protokoll von Hinnen et al. (12) transformiert. Für transformierte Hefezellen wird auf Agarplatten mit Hefe-Minimalmedium ohne Leucin selektioniert. Eine transformierte Hefekolonie wird isoliert und als Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR bezeichnet.

f) Züchten von S. cerevisiae GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR:

Zellen von S. cerevisiae GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR werden in 20 ml Hefe-Minimalmedium (Difco Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren mit Zusatz von 2 % Glukose und 20 mg/l L-Histidin) bei 30°C geschüttelt und bis zu einer Zelldichte von $3 \cdot 10^7$ Zellen/ml gezüchtet. Die Zellen werden in 0,9 % NaCl gewaschen und dann zum Animpfen von 50 ml Kulturen in low P_i -Minimalmedium benutzt. Low P_i -Minimalmedium wird entsprechend der Zusammensetzung des Difco Yeast Nitrogen Base Mediums (ohne Aminosäuren) angesetzt, enthält jedoch 0,03 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l KCl, 10 g/l L-Asparagin anstelle von $(NH_4)_2SO_4$, 2 % Glukose und 1 g/l L-Histidin. Die Kulturen werden bis zu einer Zelldichte von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml angeimpft und bei 30°C für 24 Stunden bei 200 upm geschüttelt.

g. Analyse des Produktgemisches aus der Fermentation von S. cerevisiae GRF18/pJDB207R/PHO5-HIR

Die Zellen (vgl. Beispiel 29f) werden wie üblich aufgeschlossen (vgl. z.B. Europäische Patentanmeldung Nr. 100,561). Der mit 1,5 % Essigsäure behandelte Ueberstand wird zentrifugiert und je 2 ml der klaren Lösung am "Speed Vac" Konzentrator und im Hochvakuum getrocknet. Die Proben werden einzeln in 100 μ l Wasser gelöst und einer HPLC-Analyse (Bedingungen wie in Beispiel 26a) unterworfen. Die Thrombin-Hemmung der einzelnen Fraktionen wird getestet. Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 12,8 min weist eine Thrombin-Hemmung von 89,6 % auf. Gemäss Aminosäurezusammensetzung handelt es sich um Desulfatohirudin.

Beispiel 30: Test-Kit mit monoklonalen anti-Hirudin-Antikörpern zur Bestimmung von Hirudin, kompetitiver Radio-Immunoassay

a. Herstellung der monoklonalen Anti-Hirudin-Antikörper

A) Immunisierung von Mäusen

Reines Hirudin (3 mg) in lyophilisierter Form wird in wenig 0,1 % Essigsäure gelöst und dann mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung auf 3 ml ergänzt. Der pH wird auf 7,2 eingestellt. Portionen dieser Antigen-Lösung werden mit gleichen Mengen komplettem Freund's Adjuvans oder phosphatgepufferter Salzlösung gemischt.

Weibliche Balb/c Mäuse (8 Wochen alt, erhalten von der Tierfarm Sisseln, Schweiz) werden durch Injektion von 100 µg Hirudin-Lösung in gepufferter Salzlösung intravenös injiziert. Vier Tage später wird die Milz für die Fusion entnommen.

B) Herstellung der Hybridoma und Antikörper-Test

Die Herstellung der Hybridomazellen erfolgt durch Verschmelzung der erhaltenen Milzzellen mit der Myeloma-Zelllinie X63-Ag8.6.5.3 (26). Dabei werden 10^8 Milzzellen und 10^7 Myelomazellen eingesetzt. Die Fusion wird wie beschrieben (27) durchgeführt.

Die Bestimmung der anti-Hirudin-Aktivität in den Hybridoma-Ueberständen erfolgt mit Hilfe eines Radioimmunoassays [RIA, (28)].

C) Isolierung und Reinigung der Anti-Hirudin-Antikörper aus Aszites

Balb/c Mäuse werden intraperitoneal mit 0,4 ml Pristan (Carl Roth) vorbehandelt. Nach einer Woche werden 2 bis 5×10^6 klonierte Hybridoma-Zellen intraperitoneal injiziert. Aszitische Flüssigkeit wird von jeder Maus wiederholt genommen und bei -80°C gefroren. Die gesammelte Flüssigkeit wird aufgetaut und 30 min. bei 4°C mit 16 000 upm zentrifugiert. Das Fett wird abgesaugt und zum verbleibenden Debri-freien Ueberstand langsam unter Rühren bei 0°C 0,9 Volumenäquivalente einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugetropft. Die erhaltene rohe Immunoglobulin-Fraktion wird unter Verwendung von 0,1 m Tris-HCl (pH 8.2) durch Sephadryl G 2000

(Pharmacia), gemäss den Angaben des Herstellers, gegeben. Aktive Fraktionen werden vereinigt und mit Amicon XM50-Filter (Amicon) konzentriert.

b. Test-Kit für kompetitiven Radio-Immunoassay

Eine nach Beispiel 30aC) hergestellte Lösung von anti-Hirudin-Antikörpern wird mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung) auf eine Konzentration von 1 µg pro 100 µl verdünnt. 100 µl dieser Lösung werden 2 Stunden bei 37°C in Plastik-Röhrchen oder auf Plastik-Mikrotiterplatten inkubiert, wobei Antikörper unspezifisch auf die Plastikoberfläche adsorbiert werden. Zur Absättigung der noch freien aktiven Stellen auf der Plastikoberfläche wird mit einer Bovinserum-Albumin-Lösung (BSA-Lösung) nachbehandelt.

Verdünnungsreihen einer Probelösung oder der Standardlösung in BSA-Lösung werden mit je 50 µl einer Lösung von nach bekannter Weise (29) mit radioaktivem ¹²⁵Jod markiertem Hirudin der Aktivität 10 000 cpm pro 50 µl versetzt und dann auf der Plastikoberfläche 2 Stunden bei 37°C und anschliessend 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Röhrchen oder Mikrotiterplatten werden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Die Konzentration an Hirudin in der Probelösung wird durch eine mit Standardlösung gemessene Eichkurve bestimmt.

Ein Test-Kit für den beschriebenen Radio-Immunoassay enthält:

2 ml Lösung von anti-Hirudin-Antikörper aus Beispiel 30aC) mit einer Konzentration von 1 bis 10 mg pro ml,
100 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Lösung)
100 ml 0,3 % Bovinserum-Albumin und 0,1% Natriumazid in PBS-Lösung (BSA-Lösung),
2 ml Lösung von radioaktivem Hirudin der Aktivität 200 000 cpm/ml,
2 ml Standardlösung enthaltend 100 ng/ml Hirudin,
1 ml-Röhrchen oder Mikrotiterplatten aus Plastik.

Beispiel 31: Pharmazeutisches Präparat enthaltend eine Desulfato-hirudinverbindung für parenterale Applikation

Eine Lösung, welche eine Desulfatohirudin-Verbindung gemäss Beispiel 27 enthält, wird gegen eine 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Die Konzentration der Lösung wird danach durch Verdünnen mit der gleichen NaCl-Lösung auf 0,2 mg/ml oder 2 mg/ml eingestellt. Diese Lösungen werden durch Ultrafiltration (Membranen mit 0,22 µm Poren) sterilisiert.

Die sterilisierten Lösungen sind direkt verwendbar, z.B. für die intravenöse Verabreichung. In analoger Weise werden parenteral applizierbare Lösungen hergestellt, die Mischungen von Desulfato-hirudin-Verbindungen gemäss Beispiel 27 enthalten.

Referenzen

1. J. Dodt et al., FEBS Letters 165, 180 (1984)
2. P. Walsmann et al., Pharmazie 36, 653 (1981)
3. S.A. Narang, Tetrahedron 39, 3 (1983)
4. K.L. Agarwal et al., Angew. Chem. 84, 489 (1972)
5. C.B. Reese, Tetrahedron 34, 3143 (1972)
6. R.L. Letsinger and W.B. Lunsford, J. Am. Chem. Soc. 98, 3655 (1976)
7. K. Itakura et al., J. Am. Chem. Soc. 103, 706 (1981)
8. H.G. Khorana et al., J. Biol. Chem. 251, 565 (1976)
9. S.A. Narang et al., Anal. Biochem. 121, 356 (1982)
10. K. Itakura et al., J. Biol. Chem. 257, 9226 (1982)
11. A.M. Maxam und W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 (1977); siehe auch Meth. Enzym. 65, 499 (1980)
12. A. Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929 (1978)
13. Anagnostopoulos et al., J. Bacteriol. 81, 741 (1961)
14. M. Mandel et al., J. Mol. Biol. 53, 159 (1970)
15. H.U. Bergmeyer (Hrsgb.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. II, 3. Auflage, S. 314-316, Verlag Chemie, Weinheim 1983.
16. F. Markwardt et al., Thromb. Haemostasis 47, 226 (1982)
17. Köhler und Milstein, Nature 256, 495 (1975)
18. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (ed. T. Maniatis et al.), Cold Spring Harbor Lab., 1982, S. 125
19. W. Müller et al., J. Mol. Biol. 124, 343 (1978)
20. M. Grunstein und D.S. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1979)
21. Ish-Horowitz, in loc. cit. 18), S. 368
22. DE-OS 3 111 405 (Genentech)
23. A.C. Peacock et al., Biochemistry 6, 1818 (1967)
24. U.K. Laemmli, Nature 227, 680 (1970)
25. P. Walsmann, Pharmazie 36, 860 (1981)
26. J.F. Kearney et al., J. Immunol. 123, 1548 (1979)
27. S. Alkan et al., Mol. Immunol. 20, 203 (1983)
28. I. Chard, An Introduction to Radioimmunoassay and related Techniques, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam 1978

0168342

- 102 -

29. A.E. Bolton und W.M. Hunter, Biochem. J. 133, 529 (1973)
30. J. Clarke und J. Carbon, J. Mol. Biol. 120, 517 (1978)
31. J.Y. Chang et al., Methods in Enzymology, 91, 41 (1983)
32. D.S. Holmes et al., Anal. Biochem. 114, 193 (1981)

Patentansprüche (für die Vertragsstaaten BE, DE, FR, GB, IT, NL, SE,
CH, LU)

1. Eine DNA-Sequenz, welche für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodiert, und Fragmente davon.

2. Eine DNA-Sequenz gemäss Anspruch 1 der Formel

5'	(X') _n	Met						
Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu	
GTX	GTX	TAY	ACX	GAY	TGY	ACX	GAM	
Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys	
QRS	GGX	CAM	AAV	YTZ	TGY	YTZ	TGY	
Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln	
GAM	GGX	QRS	AAV	GTX	TGY	GGX	CAM	
Gly	Asn	Lys	Cys	Ile	Leu	Gly	Ser	
GGX	AAV	AAM	TGY	ATN	YTZ	GGX	QRS	
Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	
GAY	GGX	GAM	AAM	AAV	CAM	TGY	GTX	
Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	
ACX	GGX	GAM	GGX	ACX	CCX	AAM	CCX	
Gln	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe	
CAM	QRS	CAY	AAV	GAY	GGX	GAY	ITY	
Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu	
GAM	GAM	ATN	CCX	GAM	GAM	TAY	YTZ	
Gln	NON	(X') _m						
CAM	TMK							

(I)

worin die Nukleotidsequenz beginnend mit dem 5'-Ende dargestellt ist und die Aminosäuren, für die jedes Tripplett codiert, angegeben sind, und worin bedeuten

A Desoxyadenosyl,
T Thymidyl,
G Desoxyguanosyl,
C Desoxycytidyl,
X A, T, C oder G,
Y T oder C,
Z A, T, C oder G, wenn Y = C,
oder Z = A oder G, wenn Y = T,
Q T oder A,
R C und S = A, T, C oder G, wenn Q = T,
oder R = G und S = T oder C, wenn Q = A,
M A oder G,
L A oder C,
N T, C oder A
K A oder G, wenn M = A,
oder K = A, wenn M = G,

und (X') _n und (X') _m Nukleotidsequenzen mit n und m grösser als 3 und kleiner als 100, insbesondere grösser als 5 und kleiner als 15, bedeuten, welche durch ein Restriktionsenzym erkannt und geschnitten werden können.

3. Die DNA-Sequenz der Formel

CTGGAATTCAATGGTTGTTAACACCGACTGCACCGAACATGGTCAGAACCTGTGCCCTGTGCGAAGGT
GACCTTAAGTACCAACAAATGTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCITGGACACGGACACGCTTCCA
TCTAACGTTTGCCTCAGGGTAACAAAATGCATCCTGGGTTCTGACGGTGAAAAAAACCAGTGGCTT
AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTTGTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTTGGTCACGCAA
ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCACAAACGACGGTGACTTCGAAGAAATCCCGGAAGAA
TGGCCACTTCCATGGGGCTTGGCTCAGAGTGTGCTGCCACTGAAGCTTCTTACGGCCTTCTT
TACCTGCAGTAGGGATCCIG
ATGGACGTCACTCTAGGAC

gemäss Anspruch 1.

4. Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren, und von Fragmenten davon, gekennzeichnet dadurch, dass man aus genomischer Egel-DNA das Hirudin-Strukturen isoliert, oder aus Hirudin-mRNA eine komplementäre doppelsträngige Hirudin-DNA (Hirudin-ds cDNA) herstellt, oder dass man ein für die Aminosäuresequenz von Hirudin-kodierendes Gen oder Fragmente davon mittels chemischer und enzymatischer Verfahren herstellt.

5. Ein Expressionsvektor, welcher eine für Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, dass in einer mit diesem Expressionsvektor transformierten Wirtszelle Polypeptide mit Hirudin-Aktivität exprimiert werden.

6. Ein Expressionsvektor gemäss Anspruch 5, worin die Expressionskontrollsequenz diejenige des E. coli Tryptophanoperons ist.

7. Ein Expressionsvektor gemäss Anspruch 5, worin die Expressionskontrollsequenz diejenige des Hefe-PHO5-Gens ist.

8. Ein Expressionsvektor gemäss Anspruch 5, ausgewählt aus der Gruppe der Plasmide pML310, pML311, pML312, pML313 und pML314.

9. Der Expressionsvektor pJDB207R/PHO5-HIR gemäss Anspruch 5.

10. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsvektors gemäss einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, dass die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

11. Eine Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor gemäss einem der Ansprüche 5 bis 9 transformiert ist.

12. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 11, worin die Wirtszelle ein Stamm von Escherichia coli, Bacillus subtilis oder Saccharomyces cerevisiae ist.

13. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 12, worin die Wirtszelle ein Escherichia coli-Stamm ist.

14. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 12, worin die Wirtszelle ein Saccharomyces cerevisiae-Stamm ist.

15. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 13, worin die Wirtszelle der Stamm Escherichia coli HB101 ist, der mit dem Plasmid pML310 transformiert ist.

16. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 13, worin die Wirtszelle der Stamm Escherichia coli JA221 ist, der mit dem Plasmid pML310 transformiert ist.

17. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 13, worin die Wirtszelle der Stamm Escherichia coli W3110Δ102 ist, der mit dem Plasmid pML310 transformiert ist.

18. Eine transformierte Wirtszelle gemäss Anspruch 14, worin die Wirtszelle der Stamm Saccharomyces cerevisiae GRF18 ist, der mit dem Plasmid pJDB207R/PHO5-HIR transformiert ist.

19. Verfahren zur Herstellung einer transformierten Wirtszelle gemäss einem der Ansprüche 11-18, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Wirtszelle mit einem Expressionsplasmid, das eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

20. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass mit einem Expressionsvektor, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält,

transformierte Wirtszellen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Produkt mit einem zur Aufspaltung der Disulfidbindungen geeigneten Reduktionsmittel versetzt und das erhältliche reduzierte Polypeptid mit einem zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen geeigneten Oxidationsmittel behandelt wird, und falls gewünscht, eine erhältliche Hirudin-Verbindung in eine andere Hirudin-Verbindung überführt wird, und, falls gewünscht, ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird, und/oder, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird.

21. Verfahren gemäß Anspruch 20 zur Herstellung von Verbindungen der Formel

VValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluWLeuGln

(XIV),

worin V für Val oder für Met-Val steht und W Tyr oder Tyr(-OSO₃H) bedeutet, und von Salzen solcher Verbindungen.

22. Verfahren nach Anspruch 21 zur Herstellung von Desulfatohirudin der Formel XIV, worin V für Val steht und W Tyr ist.

23. Verfahren gemäß Anspruch 20 zur Herstellung von Desulfato-hirudin-Verbindungen, welche durch RP-HPLC-Konstanten [Bedingungen: Vydac 218TP5415; 4,6 x 150 mm, Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07 % Trifluoressigsäure. Gradient: 2 min 16 % B, dann während 3 min. auf 20 % B steigern, dann während 15 min auf 25 % B steigern, dann während 27 min. auf 64 % B steigern], FPLC-Konstanten [Bedingungen: Mono Q-Säule (Pharmacia), 4,6mm x 150 mm. Puffer A:

20 mM Tris • HCl pH 7,5; Puffer B: 20 mM Tris • HCl/1 M NaCl.
Linearer Salzgradient: A: während 9 ml mit 15 % Puffer B eluieren,
während 10,7 ml auf 70 % Puffer B steigern] und UV-Absorption wie
folgt charakterisiert sind:

Verbindung A: RP-HPLC, Retentionszeit 16,83 min;
FPLC; Elution bei 390 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$;
Verbindung B: RP-HPLC: Retentionszeit 18,43 min;
Verbindung C: RP-HPLC: Retentionszeit 19,6 min;
FPLC: Elution bei 420 mM NaCl;
Verbindung D: RP-HPLC: Retentionszeit 20,6 min;
FPLC: Elution bei 460 mM NaCl;
Verbindung E: RP-HPLC: Retentionszeit 21,53 min; FPLC:
Elution bei 500 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$;

24. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man
eine erhältliche Verbindung der Formel XIV, worin V für
Met-Val steht, mittels Bromcyan in eine Verbindung der Formel XIV
überführt, worin V Val ist.

25. Verfahren zur Herstellung von Hirudin gemäss Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet, dass man eine erhältliche Verbindung der
Formel XIV, worin V für Val steht und W Tyr ist, mit einer
Tyrosin-Sulfotransferase umsetzt.

26. Die nach dem Verfahren gemäss einem der Ansprüche 20-25
erhältlichen Desulfatohirudin-Verbindungen.

27. Desulfatohirudin-Verbindungen, welche durch RP-HPLC-Kon-
stanten [Bedingungen: Vydac 218TP5415; 4,6 x 150 mm; Durchflussge-
schwindigkeit: 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B:
Acetonitril/Wasser 8:2 + 0,07 % Trifluoressigsäure. Gradient: 2 min
16 % B, dann während 3 min. auf 20 % B steigern, dann während
15 min auf 25 % B steigern, dann während 27 min. auf 64 % B stei-
gern], FPLC-Konstanten [Bedingungen: Mono Q-Säule (Pharmacia),
4,6mm x 150 mm. Puffer A: 20 mM Tris • HCl pH 7,5; Puffer B: 20 mM

Tris • HCl/l M NaCl. Linearer Salzgradient: A: während 9 ml mit 15 % Puffer B eluieren, während 10,7 ml auf 70 % Puffer B steigern} und UV-Absorption wie folgt charakterisiert sind:

Verbindung A: RP-HPLC, Retentionszeit 16,83 min;
 FPLC; Elution bei 390 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$;
 Verbindung B: RP-HPLC: Retentionszeit 18,43 min;
 Verbindung C: RP-HPLC: Retentionszeit 19,6 min;
 FPLC: Elution bei 420 mM NaCl;
 Verbindung D: RP-HPLC: Retentionszeit 20,6 min;
 FPLC: Elution bei 460 mM NaCl;
 Verbindung E: RP-HPLC: Retentionszeit 21,53 min; FPLC:
 Elution bei 500 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$.

28. Hirudin-Verbindungen der Formel

VValTyrThrAspCysIthrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
 GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
 ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluWLeuGln

(XIV),

worin V für Met-Val steht und W Tyr oder Tyr(-OSO₃H) bedeutet, und Salze von solchen Verbindungen.

29. Pharmazeutisch annehmbare Salze von Verbindungen der Formel XIV gemäss Anspruch 28.

30. Pharmazeutisches Präparat enthaltend eine Verbindung der Formel XIV gemäss Anspruch 28, ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon oder eine Verbindung gemäss Anspruch 27.

31. Verbindungen der Formel XIV oder pharmazeutisch annehmbare Salze davon gemäss Anspruch 28 zur Anwendung in einem Verfahren zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

32. Desulfatohirudin-Verbindungen gemäss Anspruch 27 zur Anwendung in einem Verfahren zur therapeutischen oder prophylaktischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

33. Verwendung von Verbindungen der Formel XIV oder pharmazeutisch annehmbarer Salze davon gemäss Anspruch 28 zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten.

34. Verwendung von Desulfatohirudin-Verbindungen gemäss Anspruch 27 zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten.

35. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 27 oder 28 als Thrombin inhibierende Mittel.

36. Hirudin- und Desulfatohirudin-spezifische monoklonale Antikörper.

37. Eine Hybridomazell-Linie, dadurch gekennzeichnet, dass sie monoklonale Antikörper gemäss Anspruch 36 ausscheidet.

38. Ein Test-Kit zur Bestimmung von Hirudin und Desulfatohirudin, dadurch gekennzeichnet, dass er monoklonale Antikörper gemäss Anspruch 36 enthält.

Patentansprüche: (für den Vertragsstaat AT)

1. Verfahren zur Herstellung von DNA-Sequenzen, die für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodieren, und von Fragmenten davon, gekennzeichnet dadurch, dass man aus genomischer Egel-DNA das Hirudin-Strukturgebenen isoliert, oder aus Hirudin-mRNA eine komplementäre doppelsträngige Hirudin-DNA (Hirudin-ds cDNA) herstellt, oder dass man ein für die Aminosäuresequenz von Hirudin-kodierendes Gen oder Fragmente davon mittels chemischer und enzymatischer Verfahren herstellt.

2. Verfahren zur Herstellung eines Strukturgens für Desulfatohirudin oder von Fragmenten davon, dadurch gekennzeichnet, dass man Segmente des kodierenden und des komplementären Stranges des Desulfato-hirudin-Gens chemisch synthetisiert und erhältliche Segmente enzymatisch in ein Strukturgebenen des Desulfatohirudins oder in Fragmente davon überführt gemäss Anspruch 1.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Herstellung einer DNA-Sequenz
der Formel

5' (X') _n		Met						
Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu	
GTX	GTX	TAY	ACX	GAY	IGY	ACX	GAM	
Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys	Leu	Cys	
QRS	GGX	CAM	AAV	YTZ	TGY	YTZ	TGY	
Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln	
GAM	GGX	QRS	AAV	GTX	IGY	GGX	CAM	
Gly	Asn	Lys	Cys	Ile	Leu	Gly	Ser	
GGX	AAV	AAM	TGY	ATN	YTZ	GGX	QRS	
Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	
GAY	GGX	GAM	AAM	AAV	CAM	TGY	GTX	
Thr	Gly	Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	
ACX	GGX	GAM	GGX	ACX	CCX	AAM	CCX	
Gln	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe	
CAM	QRS	CAY	AAV	GAY	GGX	GAY	TTY	
Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu	
GAM	GAM	ATN	CCX	GAM	GAM	TAY	YTZ	
Gln	NON	(X') _m	3'	(I)				
CAM	TMK							

worin die Nukleotidsequenz beginnend mit dem 5'-Ende dargestellt ist und die Aminosäuren, für die jedes Triplet codiert, angegeben sind, und worin bedeuten

- A Desoxyadenosyl,
- T Thymidyl,
- G Desoxyguanosyl,
- C Desoxycytidyl,
- X A, T, C oder G,
- Y T oder C,
- Z A, T, C oder G, wenn Y = C,
- oder Z = A oder G, wenn Y = T,
- Q T oder A,
- R C und S = A, T, C oder G, wenn Q = T,

oder R = G und S = T oder C, wenn Q = A,

M A oder G,

L A oder C,

N T, C oder A

K A oder G, wenn M = A,

oder K = A, wenn M = G,

und (X') _n und (X') _m Nukleotidsequenzen mit n und m grösser als 3 und kleiner als 100, insbesondere grösser als 5 und kleiner als 15, bedeuten, welche durch ein Restriktionsenzym erkannt und geschnitten werden können.

4. Verfahren gemäss Anspruch 1 zur Herstellung einer DNA-Sequenz der Formel

CTGGAATTCAATGGTTGTTACACCGACTGCACCGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGT
GACCTTAAGTACCAACAAATCTGGCTGACGTGGCTTAGACCAGTCTGGACACGGACACGCTCCA

TCTAACGTTGGGTCAAGGTAACAAATGCATCCTGGTTCTGACGGTAAAAAAACCAAGTGGT
AGATTGCAAACGCCAGTCCCATTGTTACGTAGGACCCAAGACTGCCACTTTTTGGTCACCAA

ACCGGTGAACGTACCCCCAAACCCGAGTCTCACAAACGACGGTGACTTCAAGAAATCCCGAACAA
TGGCCACTTCCATGGGGCTTGGCGTCAGAGTGTGCTGCCACTGAAGCTTCTTGGCCTCTT

TACCTGGCAGTAGGATCTG

ATGGACGTCACTCTAGGAC.

5. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsvektors, welcher eine für Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, die von einer Expressionskontrollsequenz derart reguliert wird, dass in einem mit diesem Expressionsvektor transformierten Wirt Polypeptide mit Hirudin-Aktivität exprimiert werden, dadurch gekennzeichnet, dass man in eine Vektor-DNA, welche eine Expressionskontrollsequenz enthält, eine für Desulfatohirudin kodierende DNA-Sequenz derart einfügt, dass die Expressionskontrollsequenz besagte DNA-Sequenz reguliert.

6. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionskontrollsequenz diejenige des E. coli Tryptophanoperons ist.

7. Verfahren gemäss Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionskontrollsequenz diejenige des Hefe-PHO5-Gens ist.

8. Verfahren gemäss Anspruch 5 zur Herstellung des Plasmids pML310.

9. Verfahren gemäss Anspruch 5 zur Herstellung des Plasmids pJDB207R/PHO5-HIR.

10. Verfahren zur Herstellung von transformierten Wirtszellen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Wirtzelle mit einem Expressionsvektor, der eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformiert.

11. Verfahren gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtzelle ein Stamm von Escherichia coli, Bacillus subtilis oder Saccharomyces cerevisiae ist.

12. Verfahren gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtzelle ein Escherichia coli-Stamm ist.

13. Verfahren gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtzelle ein Saccharomyces cerevisiae-Stamm ist.

14. Verfahren gemäss Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor das Plasmid pML 310 ist.

15. Verfahren gemäss Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Expressionsvektor das Plasmid pJDB207R/PHO5-HIR ist.

16. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass mit einem Expressionsvektor, welches eine von einer Expressionskontrollsequenz regulierte, für die Aminosäuresequenz von Hirudin kodierende DNA-Sequenz enthält, transformierte Wirtszellen in einem flüssigen Nährmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, kultiviert werden und das Produkt aus den Wirtszellen freigesetzt und isoliert wird, und, falls erforderlich, ein verfahrensgemäß erhältliches Produkt mit einem zur Aufspaltung der Disulfidbindungen geeigneten Reduktionsmittel versetzt und das erhältliche reduzierte Polypeptid mit einem zur Neuknüpfung von Disulfidbindungen geeigneten Oxydationsmittel behandelt wird, und falls gewünscht, eine erhältliche Hirudin-Verbindung in eine andere Hirudin-Verbindung überführt wird, und, falls gewünscht, ein verfahrensgemäß erhältliches Gemisch von Verbindungen mit Hirudin-Aktivität in die einzelnen Komponenten aufgetrennt wird, und/oder, falls gewünscht, ein erhaltenes Salz in das freie Polypeptid und ein erhaltenes Polypeptid in ein Salz desselben überführt wird.

17. Verfahren gemäß Anspruch 16 zur Herstellung von Verbindungen der Formel

VValTyrThrAspCysThrGluSerGlyGlnAsnLeuCysLeuCysGluGlySerAsnValCys
GlyGlnGlyAsnLysCysIleLeuGlySerAspGlyGluLysAsnGlnCysValThrGlyGluGly
ThrProLysProGlnSerHisAsnAspGlyAspPheGluGluIleProGluGluWLeuGln

(XIV),

worin V für Val oder für Met-Val steht und W Tyr oder Tyr(-OSO₃H) bedeutet, und von Salzen solcher Verbindungen.

18. Verfahren nach Anspruch 17 zur Herstellung von Desulfatohirudin der Formel XIV, worin V für Val steht und W Tyr ist.

19. Verfahren gemäß Anspruch 16 zur Herstellung von Desulfato-hirudin-Verbindungen, welche durch RP-HPLC-Konstanten [Bedingungen: Vydac 218TP5415; 4,6 x 150 mm, Durchflussgeschwindigkeit 1,2 ml/min; Eluent: A: 0,1 % Trifluoressigsäure, B: Acetonitril/Was-

ser 8:2 + 0,07 % Trifluoressigsäure. Gradient: 2 min 16 % B, dann während 3 min. auf 20 % B steigern, dann während 15 min auf 25 % B steigern, dann während 27 min. auf 64 % B steigern], FPLC-Konstanten [Bedingungen: Mono Q-Säule (Pharmacia), 4,6mm x 150 mm. Puffer A: 20 mM Tris + HCl pH 7,5; Puffer B: 20 mM Tris + HCl/1 M NaCl. Linearer Salzgradient: A: während 9 ml mit 15 % Puffer B eluieren, während 10,7 ml auf 70 % Puffer B steigern] und UV-Absorption wie folgt charakterisiert sind:

Verbindung A: RP-HPLC, Retentionszeit 16,83 min;
FPLC: Elution bei 390 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$;
Verbindung B: RP-HPLC: Retentionszeit 18,43 min;
Verbindung C: RP-HPLC: Retentionszeit 19,6 min;
FPLC: Elution bei 420 mM NaCl;
Verbindung D: RP-HPLC: Retentionszeit 20,6 min;
FPLC: Elution bei 460 mM NaCl;
Verbindung E: RP-HPLC: Retentionszeit 21,53 min; FPLC:
Elution bei 500 mM NaCl; UV (Wasser): $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$;

20. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man eine erhältliche Verbindung der Formel XIV, worin V für Met-Val steht, mittels Bromcyan in eine Verbindung der Formel XIV überführt, worin V Val ist.

21. Verfahren zur Herstellung von Hirudin gemäss Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man eine erhältliche Verbindung der Formel XIV, worin V für Val steht und W Tyr ist, mit einer Tyrosin-Sulfotransferase umsetzt.

22. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, dadurch gekennzeichnet, dass man eine nach dem Verfahren von Anspruch 17 erhältliche Verbindung der Formel XIV, worin V für Met-Val steht und W die angegebenen Bedeutungen hat, oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon oder eine nach dem Verfahren gemäss Anspruch 19 erhältliche Desulfahirudin-Verbindung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Hilfsstoffen mischt.

23. Verfahren zur Herstellung von Hirudin- und Desulfatohirudin-spezifischen monoklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, dass Mäuse mit Hirudin oder Desulfatohirudin immunisiert, B-Lymphozyten derart immunisierter Tiere mit Myelomazellen fusioniert, die gebildeten Antikörper ausscheidenden Hybridomazellen kloniert und in vitro oder in Mäusen kultiviert werden.

FO 7.4/UL/jt*

Fig. 1 KONSTRUKTION DES PLASMIDS pML300

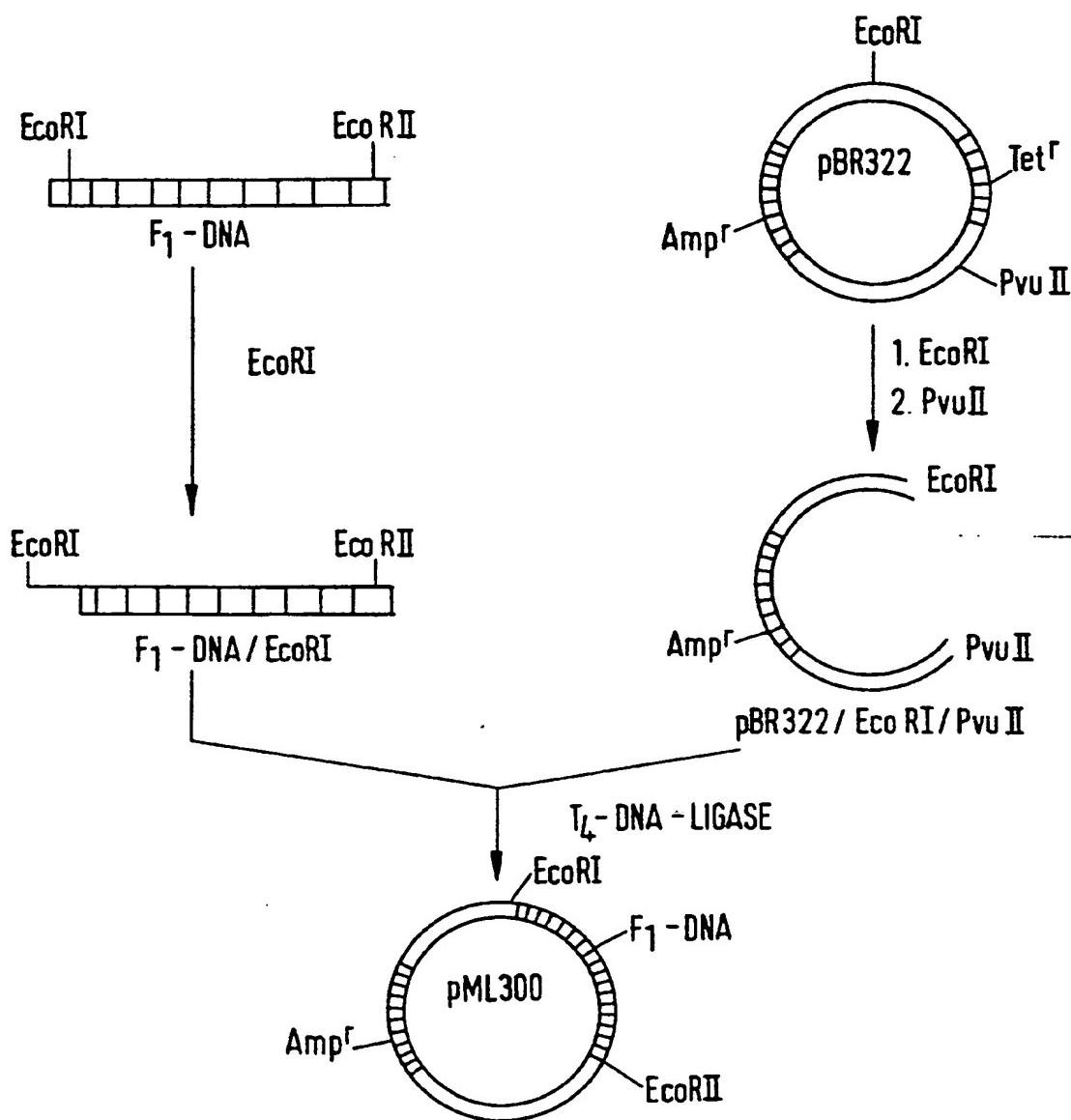


Fig. 2 KONSTRUKTION DES PLASMIDS pML305

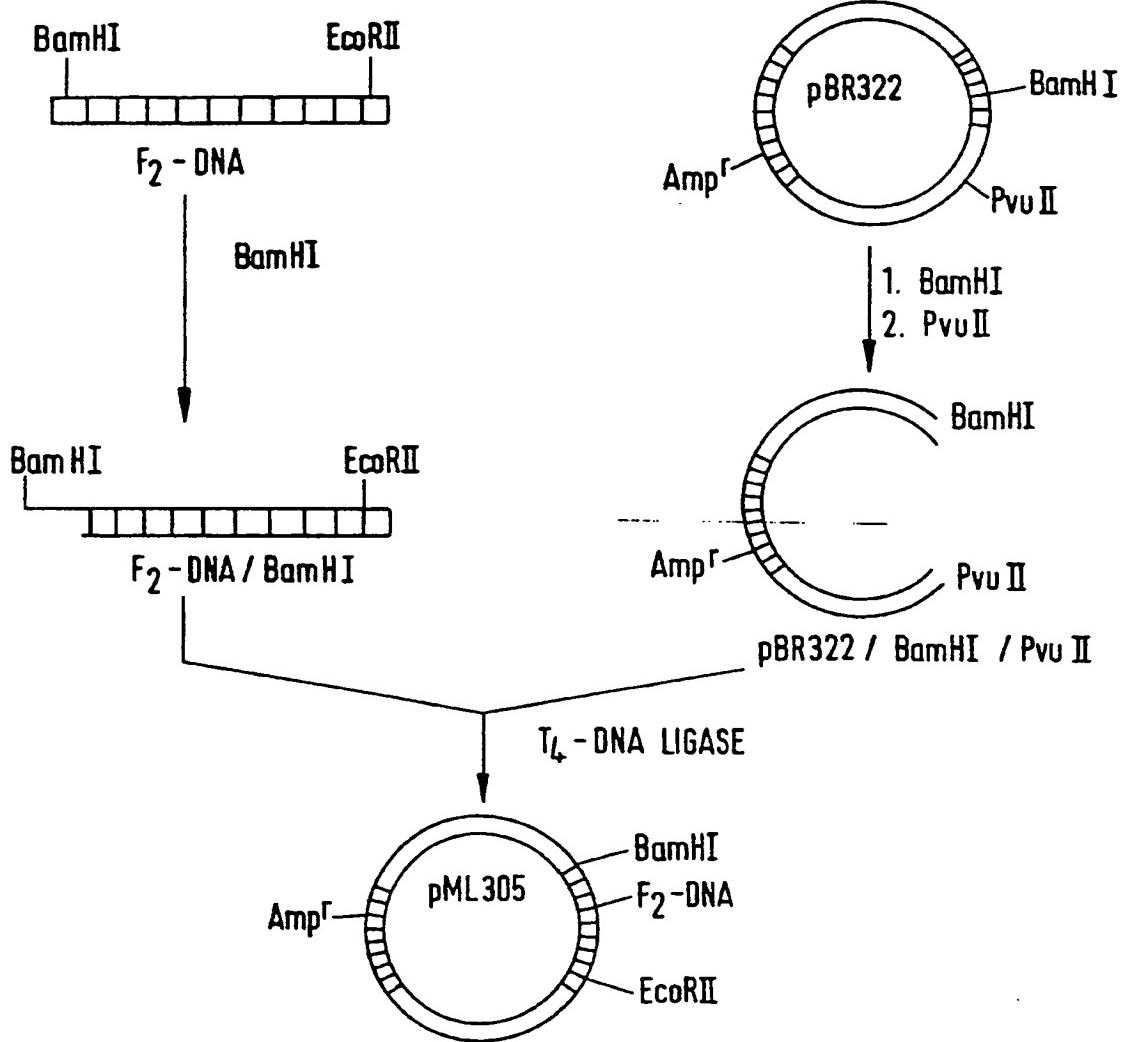


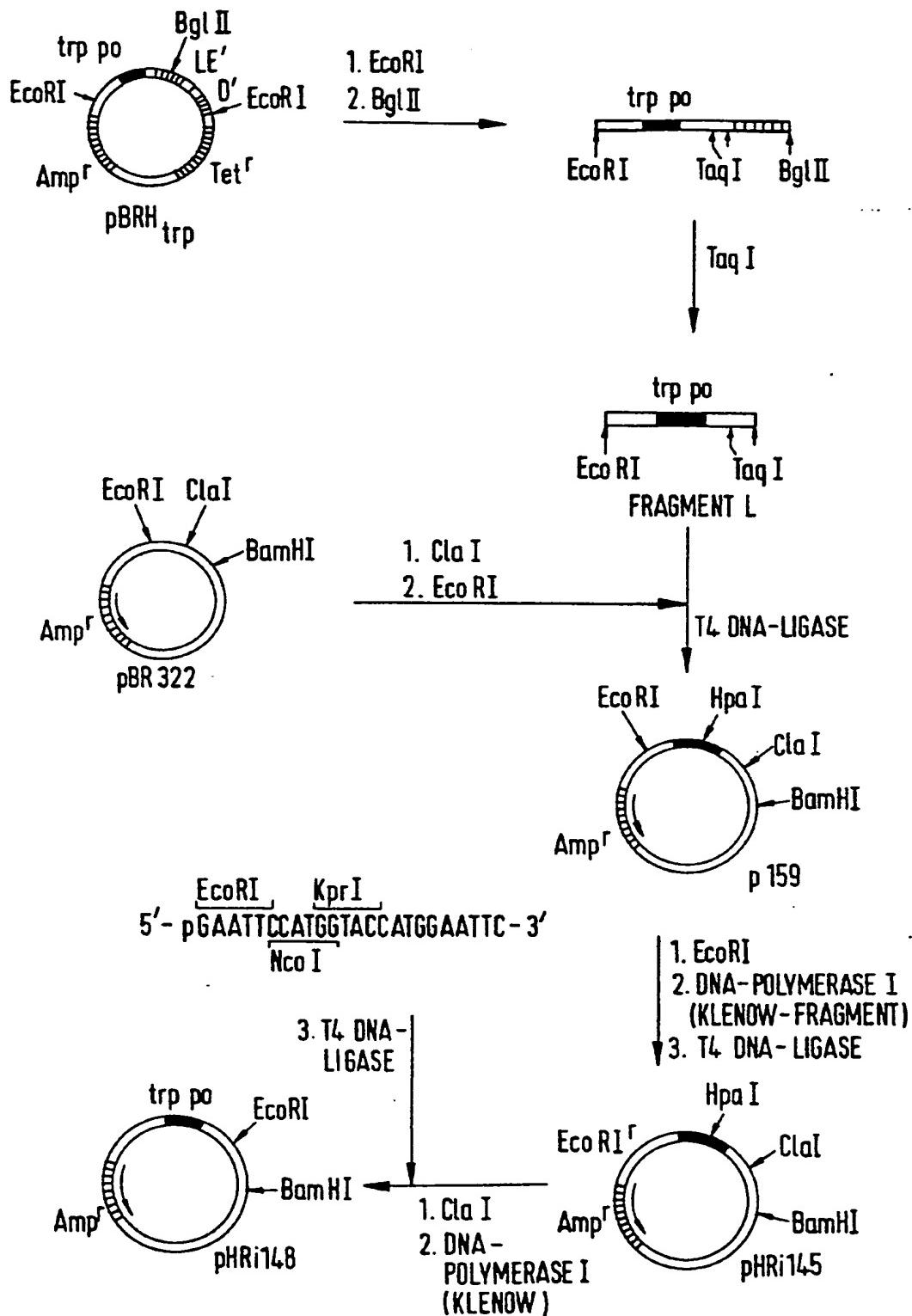
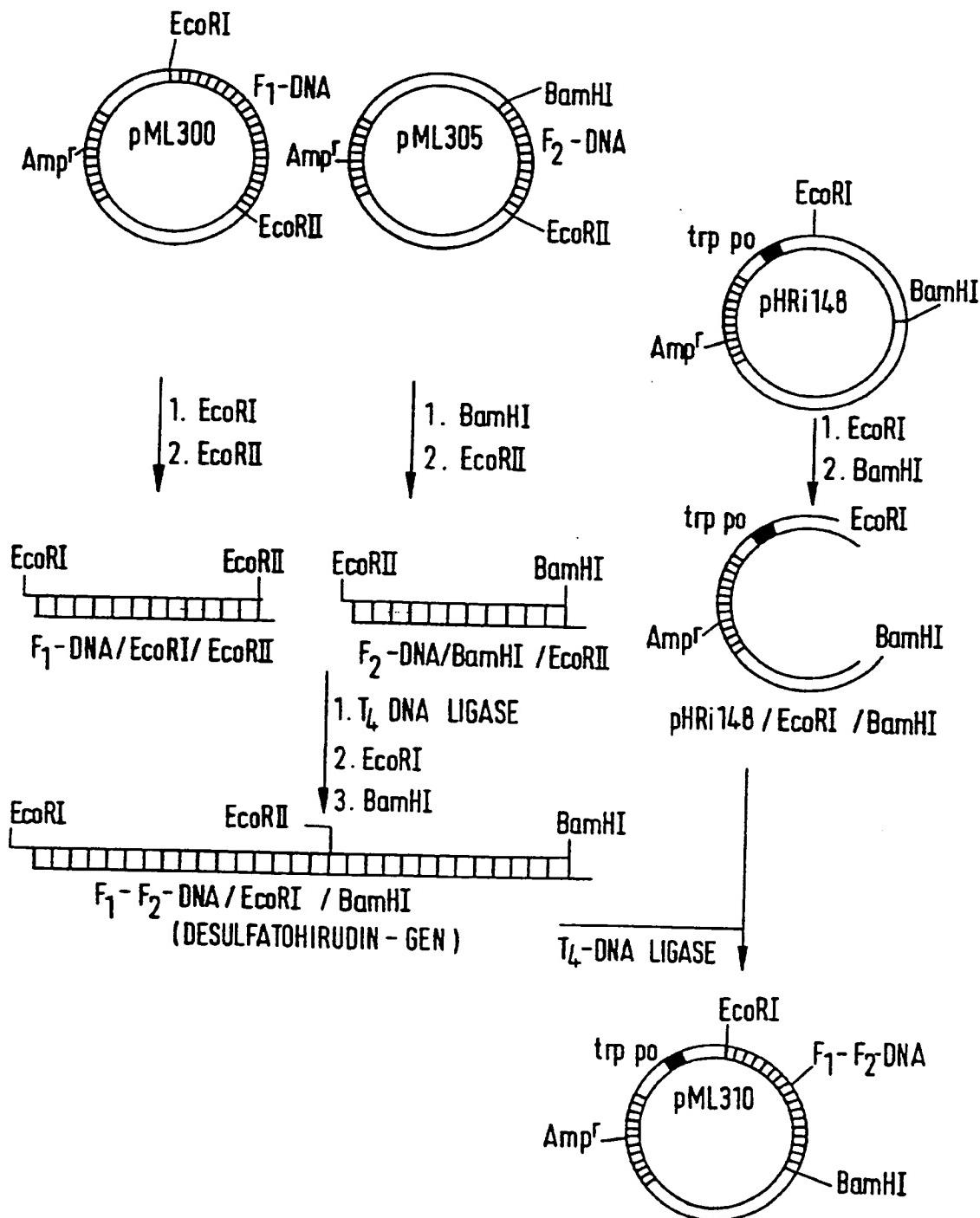
Fig. 3 KONSTRUKTION DES PLASMIDS pHRI148

Fig. 4: KONSTRUKTION DES EXPRESSIONSPLASMIDS pML310





EP 85810268.4

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
D, A	<p>FEBS LETTERS, vol. 165, no. 2, January 9, 1984, Amsterdam</p> <p>J. DODT et al. "The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor" pages 180-184</p> <p>* Totality *</p> <p>-----</p>	1, 2, 27, 28, 35	C 12 N 15/00 C 12 P 19/34 C 12 P 21/02 C 07 K 7/10 C 12 N 9/99 C 12 N 1/20 A 61 K 37/02 A 61 K 39/00 C 12 N 5/00 G 01 N 33/53 //C 12 R 1:19 C 12 R 1:125 C 12 R 1:865
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 4)
			C 12 N C 12 P C 07 K A 61 K G 01 N
	Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
WIEN	18-09-1985	WOLF	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	
X	von besonderer Bedeutung allein betrachtet	D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	
Y	von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	
A	technologischer Hintergrund	B : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
O	nichtschriftliche Offenbarung		
P	Zwischenliteratur		
T	der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		